



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARILENE NEVES DA SILVA

**Estudo translacional sobre a infecção por *Bartonella henselae* e
sua transmissão transfusional**

***Translational research about infection by *Bartonella henselae* and
its transfusion transmission***

CAMPINAS
2016

MARILENE NEVES DA SILVA

**Estudo translacional sobre a infecção por *Bartonella henselae* e sua
transmissão transfusional**

***Translational research about infection by *Bartonella henselae* and its
transfusion transmission***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em Clínica
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em
Ciências, área de concentração em Clínica Médica.*

*Ph.D. thesis presented to the Graduate Program of Medicine
from the University of Campinas Medical Sciences School for
obtaining the title of Doctor in Medicine, concentration area of
Medical Clinic.*

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

CO-ORIENTADORA: PROFa. DRa. AMANDA ROBERTA DE ALMEIDA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA MARILENE NEVES DA
SILVA, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA
VELHO.

CAMPINAS
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/22340-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Si38e Silva, Marilene Neves da, 1975-
Estudo translacional sobre a infecção por *Bartonella henselae* e sua transmissão transfusional / Marilene Neves da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.
Coorientador: Amanda Roberta de Almeida.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Bartonella. 2. Modelos animais. 3. Transfusão de sangue. 4. Pesquisa médica translacional. I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Almeida, Amanda Roberta de, 1976-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Translational research about infection by *Bartonella henselae* and its transfusion transmission

Palavras-chave em inglês:

Bartonella
Models, Animal
Blood transfusion
Translational medical research

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]
Alexsandra Rodrigues de Mendonça Favacho
Aline Aparecida Buriola
Angélica Zaninelli Schreiber
Renata Fagnani

Data de defesa: 30-05-2016

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARILENE NEVES DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

COORIENTADOR: PROFA. DRA. AMANDA ROBERTA DE ALMEIDA

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

2. PROFA. DRA. ALEXSANDRA RODRIGUES DE MENDONÇA FAVACHO

3. PROFA. DRA. ALINE APARECIDA BURIOLA

4. PROFA. DRA. ANGELICA ZANINELLI SCHREIBER

5. PROFA. DRA. RENATA FAGNANI

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 30 de maio de 2016

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Manoel Estevam (*in memoriam*)

Neste dia sinto sua presença na saudade de seu abraço confortador que me falta. Essa realização, mais que minha, é sua. Sou a continuidade do seu brilho. Por todo tempo em que viver, perpetuarei a sua memória e hei de ser fiel aos seus princípios, ensinamentos, caminhos e exemplos que deixou.

À minha mãe, Carlita

Por sempre primar pela minha educação. Obrigada por, além de me oferecer a oportunidade de estudar, sempre estar presente. Será sempre a melhor mãe do mundo!!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho, que das mais variadas formas, dedicou-se a me transmitir uma das maiores virtudes que se pode ter: o conhecimento. Suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivos colaboraram para que eu fosse além dos meus limites e medos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Amanda Roberta de Almeida, a qual aprendi a admirar e respeitar, pela paciência que teve nos momentos difíceis, pelo incentivo e fundamentalmente por acreditar em minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Rovilson Gilioli, do Cemib - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – Unicamp, por ceder o seu precioso laboratório e por estar presente desde os primórdios desta pesquisa. Agradeço por toda a sua experiência científica, paciência e ensinamentos essenciais na construção deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Lenz César, do Instituto de Física Gleb Wataghin - Unicamp, Departamento de Biofotônica, por me proporcionar a oportunidade de aprendizado e busca do conhecimento.

Ao Prof. Dr. José Vassallo do Ciped – Centro de Investigação em Pediatria- Laboratório de Investigação em Pediatria - Unicamp. Por permitir utilizar o laboratório relevante e de qualidade na área de histomorfologia.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra – Departamento de Anatomia Patológica -Unicamp - que acreditou em mim e me incentivou, sobretudo nos ensinamentos da microscopia óptica.

Às professoras que participaram da banca de qualificação, Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães e Profa. Dra. Patrícia Aline Boer, pela contribuição que trouxeram e pelo grande estímulo.

Aos meus amigos do Laboratório de Bartoneloses: Tania, Gislaine, Marina, Bruno, Luciene, Karina, que estiveram presentes em todos os momentos. Obrigada pela amizade, convivência prazerosa e ajuda imensurável na realização das pesquisas.

À Marizete Salvadego do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, por cuidar do cultivo das bartonelas com tanto carinho e empenho, sempre disposta a nos ajudar em todos os momentos.

À equipe do Laboratório de Controle Sanitário do Cemib: Daniela, Clarice, Josélia, Sílvia. Obrigada por nos ajudar em todas as horas, nos recebendo sempre de forma amável e com um sorriso amigo.

A todos do Laboratório de Hematologia (University of Minnesota, USA) que me receberam com tanto carinho e presteza. Em especial a Profa. Dra. Kalpna Gupta pela dedicação e ensino durante minha permanência naquela Instituição.

A Profa. Dra Marna Elise Ericson, Departamento de Dermatologia (University of Minnesota, USA). Estou agradecida a você e não sei como retribuir tanto carinho. Obrigada pela acolhida!

Ao LaCTAD – Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho - pelas contribuições nas análises de microscopia confocal. Felipe e Janine, serei eternamente grata a vocês!

Aos meus irmãos, Laudicéia, Marlene, Eliane, Leanai, Carlos e Josué e aos meus sobrinhos, Marisa, Giovana, Beatriz, Eduardo, Luiza e Sarah. Poderia dizer muitas coisas, mas acho que palavras não são suficientes para expressar o tamanho da minha admiração por vocês!

Ao Alexandro. Quero compartilhar essa conquista com você, que não poupou esforços para que o sorriso que hoje tenho no rosto fosse possível, que nos dias de fracasso, enxugou minhas lágrimas e respeitou meus sentimentos.

À Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - pelo apoio financeiro. (Projeto 2012/22340-5)

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - pela concessão de bolsa do Programa Ciência Sem Fronteiras. (PVE 2042/2012)

RESUMO

Bartonella é um gênero de bactérias gram-negativas, microaerófilas, fastidiosas e potencialmente fatais. Gatos e cães são reservatórios conhecidos de espécies destes agentes que usam artrópodes sugadores de sangue como vetores. As bartonelas são as únicas bactérias que infectam o interior de eritrócitos humanos e a infecção assintomática de doadores de sangue já foi relatada. Com o objetivo de estudar a infecção por *Bartonella henselae* em camundongos como modelo translacional, avaliou-se a transmissão por via transfusional destas bactérias e a infecção aguda e tardia no sangue, no baço, no fígado e na pele dos animais. No primeiro estudo camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com suspensão de *B. henselae*. Após 96 horas os animais foram eutanasiados e foram coletados fragmentos de fígado, baço e amostras de sangue. Trinta microlitros de sangue de animais inoculados com *B. henselae* foram transfundidos pelo plexo ocular para um novo grupo de camundongos. A infecção por *B. henselae* foi investigada por PCR convencional e *nested* e foi encontrada positividade por PCR *nested* no baço e no fígado de animais inoculados via intraperitoneal, mesmo quando as amostras sanguíneas eram negativas. Em metade dos animais que receberam transfusão de sangue com PCR negativas de camundongos inoculados com *B. henselae*, o DNA da bactéria foi detectado em amostras esplênicas por PCR *nested*. A transmissão de *B. henselae* por transfusão sanguínea é possível em camundongos, mesmo quando os doadores têm infecção não detectável no sangue. No segundo experimento, utilizaram-se microscopia confocal e os mesmos testes moleculares para demonstrar a infecção por *B. henselae* no sangue, pele, fígado e baço de camundongos da mesma linhagem. Amostras foram avaliadas com quatro e 21 dias após infecção experimental via intraperitoneal. O DNA da bactéria foi detectado apenas no tecido de alguns animais eutanasiados com quatro dias e no sangue de todos os animais eutanasiados com 21 dias. Resultados moleculares negativos no sangue não excluem a possibilidade de infecção por *B. henselae* em camundongos. A manifestação tardia da infecção no sangue pode ser um outro desafio para o diagnóstico, particularmente precoce, da infecção pela bactéria. Os resultados reforçam a necessidade de uma reavaliação dos riscos e do impacto da transmissão da *B. henselae* por meio de transfusões sanguíneas.

Palavras-chave: Bartonella; Modelos Animais; Pesquisa Médica Translacional; Transfusão de Sangue

ABSTRACT

Bartonella is a genus of Gram-negative, microaerophilic and fastidious bacteria that are potentially fatal. Cats and dogs are reservoirs of known species of these agents using blood sucking arthropods as vectors. *Bartonella* is the only bacterium that infects the inside of human erythrocytes and asymptomatic infection of blood donors has been reported. With the aim of studying the *B. henselae* infection in mice as a translational model, transmission via blood transfusion and acute and late infection of the blood, spleen, liver and skin of animals were evaluated. In the first study BALB / c mice were inoculated intraperitoneally with suspension of *B. henselae*. After 96 hours the animals were euthanized and liver, spleen and blood samples were collected. Thirty microliters of blood from the *B. henselae* inoculated animals were transfused by ocular plexus to a new group of animals. Infection with *B. henselae* was investigated by conventional and nested PCRs and was positive by nested PCR in spleen and liver of animals inoculated intraperitoneally, even when their blood samples were negative. DNA of the bacterium was detected in half of spleen samples from the blood transfused animals. The injected blood samples were from the *B. henselae* intraperitoneally inoculated mice but had negative blood PCRs. *B. henselae* transmission by blood transfusion is possible in mice, even when donors have not detectable blood infection. In the second experiment, confocal microscopy and the same molecular tests were used to demonstrate the *B. henselae* infection in blood, skin, liver and spleen of mice that were of the same strain. Samples were evaluated at 4 and 21 days after intraperitoneal experimental infection. The DNA of the bacterium was detected only in the tissue of some animals euthanized at 4 days and the blood of all animals euthanized at 21 days. Negative molecular results in blood not exclude the possibility of infection with *B. henselae* in mice. The late onset of the infection in the blood can be another challenge for diagnosis infection by the bacteria, especially in early diagnosis. The results reinforce the need for a reassessment of the risks and the impact of transmission of *B. henselae* through blood transfusions.

Keywords: Bartonella; Blood Transfusion; Models, Animal; Translational Medical Research

Sumário

1 Introdução.....	12
1.1 Pesquisa translacional.....	12
1.2 Bartoneloses	13
1.2.1 Aspectos clínicos	14
1.2.2 Modo de transmissão.....	17
1.2.3 Diagnóstico.....	19
2 Objetivos.....	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 Metodologia.....	22
3.1 Extração do DNA	22
3.2 PCR Controle.....	23
3.3 PCR Convencional	23
3.4 PCR <i>Nested</i>	24
3.5 Microscopia confocal	25
4 Resultados.....	27
4.1 Capítulo I.....	28
4.2 Capítulo II.....	32
5 Discussão Geral	41
6 Conclusões.....	47
Referências	48
Anexos.....	54

1 Introdução

1.1 Pesquisa Translacional

A pesquisa translacional foi assim chamada nos Estados Unidos e vem se disseminando rapidamente pelo mundo.¹ Tem como objetivo melhorar o cuidado para o paciente e promover a saúde pública. Para alcançar tal objetivo, a intenção é construir uma ponte que faça a ligação entre a bancada dos laboratórios de pesquisa e o paciente. Nesse sentido, ela envolve grande número de pesquisadores de diferentes áreas, concentrando esforços para que, por meio de suas colaborações, possam ser melhoradas a qualidade de vida e a longevidade das populações.²

Embora o termo seja bastante recente, a “noção de transferência de resultados de pesquisa” não é. A história de translação de conhecimentos vem sendo discutida desde as décadas de 1970 e 1980, nos Estados Unidos e também no Brasil. Porém, a primeira publicação sobre o assunto foi no *Journal of the American Association* (JAMA), em 2002, quando é declarada essencial para melhorar a saúde humana a “necessidade de tradução de novos conhecimentos, mecanismos e técnicas geradas pelo avanço nas pesquisas básicas para oferecer novas possibilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças”.^{3;4}

Um aspecto importante para os cientistas que defendem a pesquisa translacional é a importância do trabalho interdisciplinar para o desenvolvimento de estudos que possam, não apenas resolver os problemas de saúde dos pacientes e comunidades, mas também influenciar a formulação de políticas de saúde condizentes com a necessidade da população.³

No Brasil, ainda há necessidade do fortalecimento de estudos que realmente tenham como objetivo a transformação e a integração entre a comunidade científica e a comunidade assistencial. Para isto, as parcerias entre escolas, serviços de saúde e os cientistas são essenciais, numa alteração de papéis daquele que produz o conhecimento e daquele que aplica o conhecimento produzido.³

1.2 Bartoneloses

O termo “bartoneloses” abrange as múltiplas manifestações causadas pela infecção por espécies de *Bartonella*. Elas são bactérias negligenciadas, re-emergentes e com distribuição mundial. A maioria das espécies é de transmissão zoonótica.⁵ São cocobacilares, gram-negativas, fastidiosas e bem adaptadas a uma grande variedade de reservatórios, sobretudo mamíferos. As *Bartonella* spp. crescem em meio estéril a 37°C com 5% de gás carbônico, em ágar enriquecido com sangue (5%-10%), mas também pode crescer em meios líquidos e em cultura de tecido.⁶ Como são organismos fastidiosos, o isolamento pela cultura se torna difícil, pois requer um período de incubação prolongado e condições especiais de crescimento.⁷ O isolamento primário aparece após 12 a 14 dias em média e pode demorar até 45 dias.⁸ São capazes de causar infecção intra-eritrocitária crônica e cíclica e se supõe que também causem no hospedeiro infecção intraendotelial geralmente causando bacteremia persistente.⁹

Há dezessete espécies patogênicas ao homem^{10; 11} e a maioria destas *Bartonella* spp. são frequentemente transmitidas por animais, utilizando como vetores uma variedade de artrópodes sugadores de sangue (Quadro 1). A transmissão por meio de arranhaduras e mordeduras são citadas na literatura, mas isto não é suficiente para a transmissão entre gatos.^{12;13}

Quadro 1. Espécies de *Bartonella* patogênicas ao homem e suas manifestações clínicas

<i>Bartonella</i>	Reservatório	Vetor	Manifestações em humanos
<i>B. bacilliformis</i>	Homem	<i>Lutzomia verrucarum</i>	Doença de Carrión (febre de Oroya e verruga peruana)
<i>B. quintana</i>	Homem	Piolho de corpo	Febre, angiomatose bacilar, bacteremia e endocardite
<i>B. henselae</i>	Gato	Pulga	Doença da arranhadura do gato, linfonodomegalia, angiomatose bacilar e etc.
<i>B. clarridgeiae</i>	Gato	Pulga	Doença da arranhadura do gato
<i>B. koehlerae</i>	Gato	Pulga	Endocardite, dores nas juntas, fadiga, ansiedade e etc.
<i>B. alsatica</i>	Coelho	Desconhecido	Endocardite e linfadenite
<i>B. elizabethae</i>	Rato	Desconhecido	Endocardite e neurorretinite
<i>B. grahamii</i>	Camundongo e ratazana	Pulgas de roedores	Neurorretinite
<i>B. rochalimae</i>	Raposa, guaxinim e coioote	Pulga	Bacteremia e febre
<i>B. tamiae</i>	Ratos (?)	Ácaros (?)	Bacteremia e febre
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Arupensis</i>	Camundongo	Carrapatos (?)	Bacteremia, febre e endocardite (?)
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Berkhoffii</i>	Cachorro	Carrapatos (?)	Endocardite
<i>B. washoensis</i>	Esquilo	Desconhecido	Miocardite e endocardite (?)
<i>B. melophagi</i>	Carneiro	Desconhecido	Tosse seca, fadiga, fraqueza
<i>Candidatus B. mayotimonensis</i>	Desconhecido	Desconhecido	Endocardite
<i>B. ancashii</i>	Desconhecido	Desconhecido	Verruga peruana

Adaptado de Breitschwerdt, EB. (2014)

Embora o espectro clínico das manifestações associadas às bartoneloses tenha crescido rapidamente nas duas últimas décadas, exceto em casos de linfonodomegalia ou endocardite, os médicos normalmente não consideram a infecção por estas bactérias como diagnósticos diferenciais.⁵ Isto sugere que as bartoneloses precisam ser mais conhecidas pela comunidade dos profissionais da saúde.

1.2.1 Aspectos clínicos

As *Bartonella* spp. são responsáveis por um amplo espectro de manifestações clínicas, desde bacteremia assintomática até morbidade grave, inclusive condições potencialmente fatais.⁵ Dentre as espécies que já foram associadas à doença em humanos, três são responsáveis

pela maioria dos casos com sintomas clínicos: *Bartonella bacilliformis*, *Bartonella quintana* e *Bartonella henselae*.¹⁴

A *B. bacilliformis* é o agente etiológico da doença de Carrión que tem uma fase aguda (a febre de Oroya) caracterizada por febre, anemia hemolítica e imunodeficiência transitória, e a fase crônica (a verruga peruana) caracterizada por lesões cutâneas vasoproliferativas. A *B. bacilliformis* é transmitida por um flebótomo fêmea do gênero *Lutzomyia* e é endêmica nos Andes peruanos e em regiões do Equador e Colômbia.¹⁵ De acordo com pesquisadores, a doença está se aproximando do Brasil, e seu impacto pode ser agravado pelo modelo de desenvolvimento socioambiental adotado na Amazônia. Em 2003, chegou ao Departamento de Loreto (fronteira com o estado do Amazonas) e, em 2004, infectou 19 pessoas em Madre de Diós, que faz fronteira com o Acre e a Bolívia. O receio é que, caso esta bartonelose entre na Amazônia brasileira, sua disseminação seja acelerada pela falta de treinamento específico dos profissionais de saúde do país.¹⁶

A *B. quintana* foi inicialmente associada à febre das trincheiras, caracterizada por quadros febris recorrentes. Epidêmica nas Grandes Guerras, mais recentemente tem sido considerada re-emergente em quadros febris de andarilhos e pacientes com alcoolismo crônico,¹⁷ na Europa e nos Estados Unidos. A bactéria já foi relacionada à bacteremia crônica, endocardite e angiomatose bacilar. Como para a *B. bacilliformis*, os humanos são os únicos reservatórios conhecidos para a *B. quintana*.¹⁸

A *B. henselae* é um agente zoonótico cujo principal reservatório é o gato doméstico. Para ser transmitida entre estes animais a bactéria exige a presença de pulgas, embora a transmissão entre gatos e humanos seja frequentemente associada a arranhaduras dos animais. Pacientes imunocompetentes infectados com *B. henselae* podem desenvolver a doença da arranhadura do gato que é caracterizada por linfadenite autolimitada associada à febre. Um

amplo espectro de manifestações clínicas, porém, podem ser desencadeados pela mesma espécie, como febre prolongada de origem indeterminada, manifestações hepáticas e esplênicas, encefalopatia e endocardite.¹²

O contato com gatos é associado como fator de risco à infecção por *B. henselae*. Gatos que vivem em regiões geográficas quentes e úmidas, onde se costuma ter também um maior número de vetores artrópodes, têm um nível maior de bacteremia (7–43%) e de soroprevalência contra antígenos de *B. henselae* (4–81%).^{13; 15} Isto sugere que a infecção por estas bactérias seja mais prevalente em países em desenvolvimento e está relacionada a pobreza e em populações desfavorecidas.

Os pacientes imunodeficientes infectados com *B. quintana* ou *B. henselae* podem desenvolver angiomatose bacilar que são lesões vasoproliferativas. Estas lesões são frequentes na pele, mas podem acometer outros órgãos e ser fatal. As lesões proliferativas causadas pela *B. henselae* podem estar associadas à vasodilatação, o que é chamado de peliose.¹⁴

A *B. henselae* pode causar inflamação crônica inespecífica no fígado em adultos e crianças. Neste órgão também pode causar angiomatose e peliose bacilar, assim como hepatite granulomatosa com ou sem necrose. As bartonelas não são incluídas nos protocolos de *screening* para investigação de hepatite criptogênica e é possível que casos de hepatite que ocorrem após transplantes hepáticos possam estar relacionados à infecção por estas bactérias.¹⁹ Os médicos deveriam considerar mais o diagnóstico diferencial de infecção por *Bartonella* spp., uma vez que há um largo espectro de manifestações e complicações potencialmente associadas a estes agentes. O Quadro 2 mostra condições consideradas idiopáticas que devem incluir este raciocínio.

Quadro 2. Manifestações idiopáticas potencialmente associadas à infecção por *Bartonella* spp.

- ✓ Febre prolongada de origem desconhecida
- ✓ Anemia recorrente ou severa
- ✓ Exantema maculopapular febril
- ✓ Hepatite
- ✓ Linfadenopatia crônica
- ✓ Fadiga crônica
- ✓ Cardiomiopatia
- ✓ Reações angioproliferativas ou granulomatosas

As *Bartonella* spp. podem também causar bacteremia assintomática e cíclica em humanos e animais. A infecção assintomática crônica pode, por exemplo, estar relacionada à posteriormente endocardite, que pode ser fatal.¹²

1.2.2 Modo de transmissão

A soroprevalência em humanos ao redor do mundo varia de 1,5 a 77,5%.²⁰ Em um estudo realizado com 437 indivíduos saudáveis de uma área rural de Minas Gerais, detectou uma soroprevalência de 12,8% para *B. quintana* e 13,7% para *B. henselae*.²¹

Muitos artrópodes flebotomíneos já foram confirmados como vetores competentes na transmissão de diversas espécies de *Bartonella*. Cada espécie de *Bartonella* está relacionada a um vetor e um hospedeiro preferencial, por exemplo, o mosquito (*Lutzomyia verrucarum*) como vetor de *B. bacilliformis* em seres humanos, o piolho de corpo (*Pediculus humanus humanus*) como vetor de *B. quintana* também em humanos, e a pulga (*Ctenocephalides felis*) como vetor de *B. henselae* em gatos.²² A pulga também transmite a *B. clarridgeae*, *B.*

*koehlerae*²³ e potencialmente a *B. quintana*.²⁴ Assim, esse ectoparasita comum pode ser considerado uma importante fonte zoonótica de transmissão das *Bartonella* spp.. Apesar desta associação, esta especificidade não é exclusiva, podendo ocorrer a transmissão para hospedeiros acidentais (como a infecção de *B. henselae* em humanos, apesar de ser adaptada a gatos). Recentemente, os carrapatos foram incluídos como vetores para as espécies de *Bartonella*.^{25; 26} Além destes modos de transmissão apresentados, há relatos de transmissão de *Bartonella* spp. entre humanos por transplante de órgãos sólidos, transmissão vertical e transmissão acidental.^{27; 28; 29; 30; 31; 32}

Em receptores de transplante de órgão sólidos, um estudo revisou 29 casos de receptores transplantados que desenvolveram infecção por *B. henselae* após o transplante. O maior número de pacientes infectados ocorreu após transplantes de rim e de fígado.³²

Relatos de transmissão vertical fornecem evidências moleculares e microbiológicas que as *Bartonella* spp. podem ser transmitidas intraútero ou durante o parto.^{27; 28} Um estudo recente relata o caso de uma criança de três anos de idade, nascida de uma mulher assintomática, que apresentava anemia, icterícia e hepatoesplenomegalia desde o nascimento. A infecção perinatal por *B. henselae* foi sugerida com base na microscopia ultraestrutural em biópsia de fígado e a detecção molecular em amostra de sangue da mãe e da paciente.²⁹ A transmissão transplacentária de *Bartonella* spp. também já foi documentada em camundongos infectados experimentalmente com *B. birtlesii*.³³

Na transmissão acidental, há dois relatos de transmissão da infecção a veterinários, a partir de acidente percutâneo com agulhas com sangue contaminado de animais.^{30; 31}

Considerando o fato de que as *Bartonella* spp. podem causar infecção assintomática, a quantidade de pessoas infectadas pode ser maior do que se tem conhecimento. Hospedeiros assintomáticos com infecção intraeritrocitária podem doar sangue. Pachas-Chávez³⁴ relatou um caso de possível transmissão transfusional de *B. bacilliformis*.

Mais recentemente, 500 doadores de sangue, do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, foram avaliados e anticorpos anti-*B. quintana* e anti-*B. henselae* foram detectados em 32% (136/500) e 16,2% (78/500), respectivamente. O mesmo estudo encontrou infecção sanguínea por *Bartonella* spp. por métodos moleculares em 3,2% dos doadores e a *B. henselae* foi isolada de 1,2%.⁵

A transfusão sanguínea representa um risco na transmissão destes agentes. Gatos já foram infectados experimentalmente com sangue doado de animais infectados com *B. henselae* e com *B. clarridgeiae* por via intravenosa e intramuscular.³⁵ O estudo de Magalhães *et al*, 2008, realizado na Unicamp, demonstrou que a *B. henselae* sobrevive à 4° C por período de estocagem convencional de bolsas de sangue.³⁶ Uma revisão publicada no *Transfusion* sobre patógenos emergentes de potencial transmissão transfusional, considerou o estudo citado como aquele que introduziu o risco da *B. henselae* ser transmitida por via transfusional.³⁷ A real prevalência global da infecção entre doadores de sangue é desconhecida, e não há rotineiramente *screening* utilizado para investigar esta infecção em hemoderivados doados.

1.2.3 Diagnóstico

O uso de técnicas convencionais para isolar ou detectar o DNA destas bactérias, mesmo em animais ou humanos sintomáticos, é frustrante, dada a natureza fastidiosa das *Bartonella* spp., da baixa bacteremia em hospedeiros humanos, além da possibilidade da bacteremia cíclica. Mesmo uma abordagem microbiológica baseada em sorologia, exame anatomopatológico ou técnicas moleculares, muitas vezes fracassam em detectar a infecção nos pacientes.^{5; 9} Metodologias diferentes como cultura líquida e sólida, múltiplas reações de PCR e sorologia têm sido utilizadas em conjunto, com a finalidade de diminuir os resultados falsos negativos e aumentar a sensibilidade do diagnóstico, mas ainda não existe uma metodologia única considerada padrão ouro.^{5; 8}

Para a PCR, além do *primer* que determina a região a ser amplificada e a sensibilidade da reação, a metodologia escolhida também influencia no sucesso do diagnóstico. Estudo realizado por Pennisi *et al.*³⁸ com 85 gatos comprovou que o uso da dupla amplificação aumenta a sensibilidade de detecção da bacteremia causada pela *Bartonella* spp.. Outro estudo do grupo da Unicamp também mostrou que a combinação de metodologias também aumentou a sensibilidade diagnóstica da infecção em gatos.³⁹

O diagnóstico de bartonelose continua sendo um problema, devido à dificuldade em isolar a bactéria. Sempre que possível deve-se realizar a combinação de métodos diagnósticos.⁴⁰

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Estudar a infecção por *Bartonella henselae* em camundongos BALB/c como modelo translacional.

2.2 Objetivos Específicos

- Artigo I: Avaliar a possibilidade da transmissão de *Bartonella henselae* por via transfusional.
- Artigo II: Avaliar a infecção aguda e tardia por *Bartonella henselae* no sangue, no baço, no fígado e na pele dos animais.

3 Metodologia

Os protocolos dos dois experimentos foram submetidos à Comissão de Ética do Uso de Animais da Unicamp e foram aprovados por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (Anexo I) adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c fêmeas, com oito semanas de idade e peso entre 20 e 22 gramas. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em isoladores, instalados em sala com temperatura de 25°C e umidade controlada, com ciclo de 12h claro / 12 horas escuro, com livre acesso à água e ração (Nuvital, Curitiba, Paraná, Brasil). Para o procedimento de infecção, as suspensões de inoculação foram preparadas utilizando cepa padrão *B. henselae* (Houston 1, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, ATCC 49882T) em solução salina.

As amostras de sangue foram coletadas de forma asséptica por punção intracárdica com seringas previamente umedecidas com anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) estando os animais anestesiados com quetamina e xilazina (150 mg/Kg - 10mg/Kg) e com o tórax aberto. As amostras teciduais também foram coletadas de forma asséptica. Para a obtenção dos fragmentos cutâneos utilizaram-se *punches* de 6mm de diâmetro. Posteriormente as amostras foram congeladas a -20°C.

3.1 Extração do DNA

As técnicas moleculares foram realizadas em quatro salas separadas para evitar a contaminação do DNA. O fluxo de trabalho foi unidirecional entre as áreas pré-PCR (manuseamento das amostras, preparação e extração do DNA) e entre as áreas pós-PCR (amplificação do DNA e detecção dos produtos da amplificação). Todo material utilizado era descartável e os equipamentos eram específicos de cada sala. Foram realizados rigorosos

procedimentos laboratoriais a fim de se evitar a contaminação dos reagentes e do material amplificado.⁴¹

As amostras de sangue foram congeladas por 24 horas, para a lise das hemácias, antes da extração, já que este método se mostrou eficiente para a liberação das bactérias intracelulares.⁴²

Para a extração do DNA das amostras, utilizou-se o *kit* comercial RTP Bacteria Mini Kit® (Strattec Molecular), de acordo com as recomendações do fabricante.

A cada extração realizada foram adicionados dois controles: o branco (apenas os reagentes da reação) e um controle positivo (sangue infectado com cepa de *B. henselae*).

3.2 PCR controle

Todas as amostras extraídas foram testadas com PCR para amplificação de um gene constitutivo. A região escolhida foi um fragmento da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), uma enzima relacionada com a glicólise e expressa por todas as células de mamíferos. Esta reação tem como objetivo a verificação da qualidade do DNA extraído, além da certificação da inexistência de inibidores de amplificação. O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho de 350 pares de bases (pb).³⁹ As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

O amplificado foi obtido em todas as amostras, mostrando a presença de DNA íntegro e ausência de inibidores da PCR.

3.3 PCR convencional

As amostras de DNA do foram submetidas à PCR convencional, específica para amplificação da região ITS, ou a região intergênica 16S-23S do RNAr. A reação foi realizada com *primers* previamente descritos.⁴³ O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho de

604 pb. O limite de detecção observado para esta PCR foi de cinquenta cópias.³⁹ As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

3.4 PCR *nested* (PCR de dupla amplificação)

As amostras de DNA foram submetidas à PCR *nested* espécie-específica para a região alvo que codifica a proteína *FtsZ* que atua na divisão celular da bactéria. A reação foi realizada com os *primers* descritos no trabalho de Kawasato *et al.*⁴⁴ O fragmento amplificado nesta reação tem o tamanho de 218 pb. O limite de detecção observado para esta PCR foi de dez cópias.³⁹ As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* usados nas PCR

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'
GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT
GAPDH R	CCAAACTTGTCATGGATGACC
ITS F	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTT(Y)TGGCG
ITS R	GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA
BHF	GCC GCA AAG TTC TTT TCA TG
BHR	AGG TGA ACG CGC TTG TAT TTG
BHS	CAA AAC GGT TGG AGA GCA GT
BHA	CGC CTG TCA TCT CAT CAA GA

3.5 Microscopia confocal

A microscopia confocal é um desenvolvimento na microscopia óptica. Assim como na microscopia de fluorescência, as amostras são coradas com fluorocromos para que emitam, ou devolvam, a luz. Na microscopia confocal, um plano de uma pequena região de uma amostra é iluminado com um laser, que passa a luz devolvida através de uma abertura alinhada com a região iluminada. Cada plano corresponde a uma imagem de um corte fino que foi fisicamente seccionado de uma amostra. Os planos e as regiões sucessivos são iluminados até que toda a amostra tenha sido examinada. Uma vez que a microscopia confocal usa um orifício puntiforme, elimina o borramento da imagem que ocorre com outros microscópios. Como resultado, imagens bidimensionais excepcionalmente claras podem ser obtidas, com uma resolução até 40% melhor que a dos outros microscópios.⁴⁵

O microscópio confocal utilizado neste estudo, atende a uma grande gama de exigências para geração de imagens confocais e multifotônicas. O equipamento é composto pelos lasers Argônio, Hélio-Neônio 543 e Hélio-Neônio 633 e pelas objetivas com aumentos de 10, 20 e 63 vezes, sendo esta última disponível apenas em imersão com óleo.

Após a eutanásia dos animais, os fragmentos de tecidos adquiridos com o auxílio de *punch* de 6mm foram colocados em solução de PBS (tampão fosfato-salino) com formol a 4% por 24 horas. Em seguida foram lavados em água corrente por 24 horas e depois mantidos em álcool 70%. Posteriormente, os tecidos passaram por sequências alcoólicas (80, 90 e 95% por uma hora cada). Após a desidratação passaram por dois banhos de xilol, dois de parafina e em seguida, incluídos em parafina.

Cortes de seis micras foram colocados em lâminas silanizadas. Para desparafinização, as lâminas ficaram por 35 minutos em estufa a 60°C e em seguida passaram por dois banhos de xilol, banhos consecutivos de álcool (100, 95, 80 e 70%) e água bidestilada. As amostras foram permeabilizadas com Triton 5% em PBS durante 15 minutos, lavadas em três banhos de PBS. Em

seguida bloqueou-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e metanol (30µL de H₂O₂ e 970 µL de metanol) por 15 minutos, lavou-se novamente em PBS. Para exposição de epítomos, os cortes foram tratados com tampão citrato 10mM (pH=6,0), colocadas em banho-maria em forno micro-ondas por 10 minutos e esfriadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Para evitar ligações inespecíficas, as amostras foram bloqueadas com soro animal 5% e BSA 3% em PBS por 60 minutos. Em seguida foram cobertas com anticorpo primário monoclonal diluído conforme Quadro 3 e colocadas a 4°C *overnight*. No dia seguinte, após lavagem com PBS os cortes foram tratados com anticorpo secundário, diluído conforme teste de curva de concentração realizado previamente, por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida foram lavados durante 10 minutos por 3 vezes com PBS, seladas com *Vectashield*[®] (Vector Labs) e cobertos com lamínulas. As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 II. As imagens foram analisadas utilizando software *ImageJ*.

Quadro 3: Anticorpos utilizados no ensaio

	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
<i>Bartonella henselae</i>	Anti- <i>Bartonella henselae</i> Mouse monoclonal [H2A10] Abcam® Diluição: 1:100	Donkey Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor® 555) diluição: 1:1000

4 Resultados

Esta tese de doutorado está estruturada conforme Formato Alternativo, normatizado pela Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas, 2008), sob o parecer PG nº 1985/96.

4.1 Capítulo I (artigo publicado no *Transfusion*).

DONOR INFECTIOUS DISEASE TESTING

***Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice**

Marilene Neves da Silva,¹ Gislaine Vieira-Damiani,^{1,2} Marna Elise Ericson,³ Kalpna Gupta,⁴
 Rovilson Gilioli,⁵ Amanda Roberta de Almeida,¹ Marina Rovani Drummond,¹
 Bruno Grosselli Lania,¹ Karina de Almeida Lins,¹ Tânia Cristina Benetti Soares,¹ and
 Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho¹

BACKGROUND: *Bartonella* spp. are neglected fastidious Gram-negative bacilli. We isolated *Bartonella henselae* from 1.2% of 500 studied blood donors and demonstrated that the bacteria remain viable in red blood cell units after 35 days of experimental infection. Now, we aim to evaluate the possibility of *B. henselae* transmission by blood transfusion in a mouse model.

STUDY DESIGN AND METHODS: Eight BALB/c mice were intraperitoneal inoculated with a 30 μ L of suspension with 10⁴ CFU/mL of *B. henselae* and a second group of eight mice were inoculated with saline solution and used as control. After 96 hours of inoculation, the animals were euthanized. We collected blood and tissue samples from skin, liver, and spleen. Thirty microliters of blood from four *Bartonella*-inoculated animals were transfused into a new group (n = 4). Another group received blood from the control animals. *B. henselae* infection was investigated by conventional and nested polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS: Blood samples from all 24 mice were negative by molecular tests though half of the tissue samples were positive by nested PCR in the intraperitoneal *Bartonella*-investigated animals. Tissues from two of the four mice that received blood transfusions from *Bartonella*-inoculated animals were also nested PCR positives.

CONCLUSIONS: Transmission of *B. henselae* by transfusion is possible in mice even when donor animals have undetectable bloodstream infection. The impact of human *Bartonella* sp. transmission through blood transfusion recipients must be evaluated.

Bartonella spp. are fastidious Gram-negative bacilli with worldwide distribution. They are reemerging and neglected zoonotic agents. These bacteria can cause several human diseases including Peruvian bartonellosis, trench fever, cat scratch disease, bacillary angiomatosis, and endocarditis. *Bartonella* infection can be fatal, especially in immunocompromised patients. Its prevalence among blood donors is unknown, and screening of blood supplies for this pathogen is not routinely performed because the fastidious characteristics of this organism pose a major challenge in reaching a diagnosis.¹ Moreover, automated

From the ¹Division of Dermatology, Department of Medicine, University of Campinas (UNICAMP) Medical School, Campinas, SP, Brazil; the ²Federal Institute of Education, Science and Technology, Jaguariáiva, PR, Brazil; the ³Department of Dermatology and ⁴Division of Hematology, Oncology and Transplantation, Department of Medicine, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota; and the ⁵Laboratory of Animal Quality Control, Multidisciplinary Center of Biological Investigation (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

Address reprint requests to: Marilene Neves da Silva, Division of Dermatology, Department of Medicine, University of Campinas (UNICAMP) Medical School, Campinas, 13083-970, São Paulo, Brazil; e-mail: mnsilva31@gmail.com.

This article was published online on 10 March 2016. After online publication, revisions were made to the text. This notice is included in the online and print versions to indicate that both have been corrected on 30 March 2016.

We thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for their financial support (2012/22340-5) to MNS, CAPES PVE 2012/2042 to PENFV, and NIH UO1 HL117664 to KG.

Received for publication September 30, 2015; revision received December 9, 2015; and accepted January 9, 2016.

doi:10.1111/trf.13545

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;56:1556–1559

detection is based on CO₂ production and *Bartonella* spp. do not generate sufficient CO₂ to give a positive signal.²

The human-specific species *Bartonella quintana* and *Bartonella bacilliformis* and the zoonotic cat-related species *Bartonella henselae* are typically associated with human manifestations. Infection of immunocompetent patients with *B. henselae* results in cat scratch disease, a typically self-limiting swelling of lymph nodes often associated with fever. In immunocompromised patients infection with *B. quintana* or *B. henselae* can develop serious complications with vasoproliferative lesions known as bacillary angiomatosis. Long-term infection with *Bartonella* spp. can involve skin, liver, spleen, lung, bone, or brain.^{1,3}

The transmission of *Bartonella* spp. to humans usually occurs by traumatic contact with infected animals or by blood-sucking arthropods. *B. henselae* can multiply in the cat flea and persist in flea feces in the environment for at least 9 days.³ Blood transfusion also represents a risk: cats have been experimentally infected with *B. henselae* and *Bartonella clarridgeiae* by intravenous or intramuscular inoculation with infected cat blood.⁴ *B. bacilliformis* human blood transmission has already been documented⁵ and solid organ transplant recipients can also be infected by *Bartonella* spp. that may result in fatal outcomes.^{1,6}

The fastidious growth characteristics of *Bartonella* spp. and its capacity to partially evade the host immune system and typically to cause a chronic infection still pose a problem for diagnosis and treatment. The intracellular location, frequent genetic rearrangements, and alteration of outer membrane proteins are considered important for the maintenance of persistent bacteremia.⁷

After intradermal inoculation the *Bartonella* infection spreads to a still enigmatic primary infection niche, although it likely includes the vascular endothelium. Inside the mammalian reservoir host, the infection spreads to the blood where bacteria invade red blood cells (RBCs) and may cause a long-lasting intraerythrocytic bacteremia, an hallmark of *Bartonella* infection.⁸

Bartonella spp. are able to infect and survive inside RBCs.⁹ In vitro *Bartonella* spp. will invade RBCs, multiply within, and persist for the lifetime of the infected host cell.⁸ Previous studies from our group using transmission electron microscopy and culture isolation have documented the ability of *B. henselae* to survive in stored blood for 35 days of storage at 4°C.¹⁰ This study was considered important to include *Bartonella* spp. as a pathogen with risk of transmission by transfusion.¹¹ Ruiz and colleagues¹² also demonstrated the ability of *B. bacilliformis* to survive long periods of time in blood samples stored at 4°C.

Allogenic blood transfusion can be a source of blood-stream infection.¹³ Approximately 13,785,000 units of RBCs and whole blood were transfused in 2011 only in the United States.¹⁴ In 2012, a total of 3,127,957 transfusions were performed in Brazil.¹⁵ The screening of bacterial contamination in donated blood components is a challenge since the initial bacteremia can be extremely low

and difficult to detect. Efficient and rapid laboratory tests are not available.¹⁶

Bartonella transmission was reported in two accidental percutaneous punctures in veterinarians with contaminated animal blood.^{17,18} Recently, we isolated *Bartonella* spp. from 1.2% of 500 Brazilian blood donors and demonstrated *B. henselae* DNA in blood samples of 3.2% of these donors.¹ We hypothesized that *B. henselae* could cause infection in a mouse model taking blood from a *Bartonella*-bacteremic donor to a healthy recipient.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiments were conducted using 24 isogenic, female, 8-week-old, BALB/c mice (20–22 g of weight). All the experimental protocols were approved by Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Campinas.

Bacterial suspension

A bacterial suspension was prepared using *B. henselae* (Houston 1, American Type Culture Collection, Rockville, MD; ATCC 49882T) with 10⁴ colony forming bacterium units (CFU) concentration in 0.9% NaCl.

Experimental design and transfusion

An overview of the experimental performed procedures is presented in Fig. 1. Eight mice were infected by intraperitoneal inoculation with 30 µL of a suspension with 10⁴ CFU/mL *B. henselae*. Eight control mice were inoculated with the same volume of saline. After 96 hours, four *Bartonella*-inoculated and four control mice were euthanized with overdose of thiopental. We collected blood and tissue fragments of skin, liver, and spleen. We collected blood in sodium heparin tubes from the other four *Bartonella*-inoculated animals and immediately transfused 30 µL, by injection in the ocular venous plexus, into a new group of mice (n = 4) that were anesthetized with ketamine and xylazine (150 mg/Kg / 10 mg/Kg). The same blood collection and transfusion procedures were performed from saline-inoculated mice to a second set of uninfected animals used as control group (n = 4). On the fourth day posttransfusion, the animals were euthanized with pentobarbital and we collected blood samples and skin, liver, and spleen fragments. We did not observe any clinical signs in infected animals.

Polymerase chain reaction screening

DNA from whole blood and from skin, liver, and spleen fragments were extracted using Bacteria DNA mini kit (RTP; Stratec Molecular) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA samples were tested by genus-specific conventional polymerase chain reaction (PCR) targeting 16S to 23S ribosomal RNA intergenic spacer.¹⁹ We also performed *B. henselae* species specific nested PCR

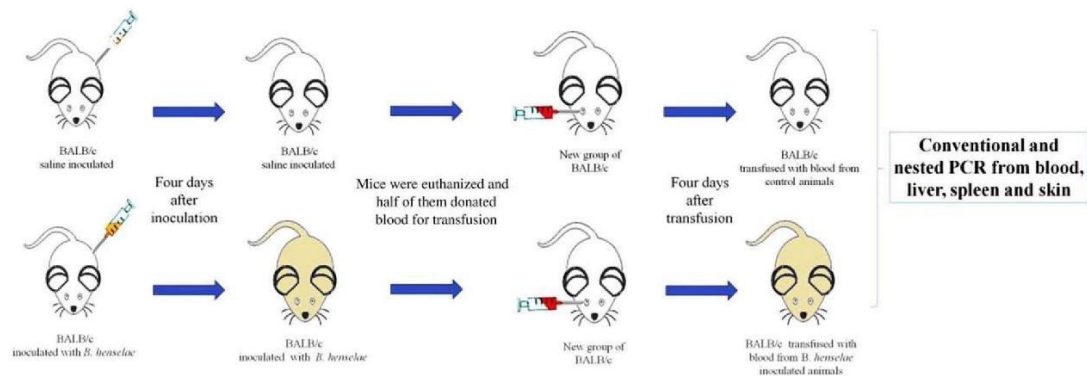


Fig. 1. Animal infection and samples collection scheme.

TABLE 1. Diagnosis results of the molecular techniques used to detected <i>Bartonella</i> infection				
PCR	Inoculated (IP)		Transfused (IV)	
	Control*	<i>Bartonella</i> *	<i>Bartonella</i> *	Control*
Conventional				
Blood	0/8	0/8	0/4	0/4
Skin	0/4	0/4	0/4	0/4
Liver	0/4	0/4	0/4	0/4
Spleen	0/4	0/4	0/4	0/4
Nested				
Blood	0/8	0/8	0/4	0/4
Skin	0/4	0/4	0/4	0/4
Liver	0/4	1/4	0/4	0/4
Spleen	0/4	2/4	2/4	0/4

* No. of positive samples/total of samples tested.
IP = intraperitoneal; IV = intravenous.

targeting *ftsZ* region using primers previously described.²⁰ To avoid contamination, these techniques were performed as described by Pitassi and colleagues.¹

RESULTS

Our sensitivity in conventional PCR was 50 copies/mL and in nested PCR it was 10 copies/mL. In two of the four animals inoculated intraperitoneally with a *B. henselae* suspension, one liver and two spleen fragments were *B. henselae* positive by nested PCR. Two of the four animals that received blood transfusion from *Bartonella*-intraperitoneal-inoculated mice also had positive spleen nested PCR, even though blood molecular tests were negative to *B. henselae* from the 24 animals (Table 1).

DISCUSSION

It is estimated that *Bartonella* spp. bacteremia in asymptomatic subjects is approximately 10 CFU/mL blood, which may be below the detection limit of most conven-

tional or real-time PCR assays.²¹ We were able to detect tissue infection only using nested PCR, which suggests low bacteremia once nested PCR is admittedly more sensitive than conventional PCR.²⁰

B. henselae typically causes self-limiting, asymptomatic infection in humans, but, for some individuals, the bacteremia can become chronic and sometimes the infection can be fatal.¹ Stramer and colleagues^{11,22} describe the potential threat of emerging infectious disease agents to transfusion safety and our data indicate that *Bartonella* spp. could fall into that category. Other *Bartonella*-related organisms such as *Borrelia burgdorferi*, *ehrlichiae*, and *Rickettsia rickettsii* had biologic plausibility of blood transfusion transmission. Despite this, these agents have been conclusively documented only for *Babesia* sp. (>20 cases) and *R. rickettsii* (one case).²³

Bartonella spp. have the ability to course with subclinical chronic infection. Because of the slow doubling time of *Bartonella* spp. manifestation of bartonellosis in a patient that has been transfused with *Bartonella*-infected blood could occur much later and therefore not be linked with the transfusion procedure. These data reinforce that most transfusion transmissions with this bacterium are underrecognized.

B. henselae transmission through transfusion blood had already been demonstrated in cats.²⁴ This study shows that transmission of *B. henselae* by transfusion is possible in mice even when the blood of the donor animals had no detectable bacteremia. We could not detect, by conventional or nested PCR, *B. henselae* in the blood of animals at Day 4 postintraperitoneal inoculation with *B. henselae*. These data reinforce the possibility of *B. henselae* infection by blood transfusion and that blood-negative PCR does not exclude the possibility of infection by this bacterium.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the staff of the Life Sciences Core Facility (LaCTAD) from University of Campinas (UNICAMP), for their assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest

REFERENCES

- Pitassi LH, de Paiva Diniz PP, Scorpio DG, et al. Bartonella spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. PLoS Negl Trop Dis 2015;9:e0003467.
- Anderson BE, Neuman MA. Bartonella spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997;10:203-19.
- Bouhsira E, Franc M, Boulouis HJ, et al. Assessment of persistence of Bartonella henselae in Ctenocephalides felis. Appl Environ Microbiol 2013;79:7439-44.
- Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, et al. Experimental and natural infection with Bartonella henselae in domestic cats. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1997;20:41-51.
- Maguina VC. Bartonelosis o Enfermedad de Carrion. Nuevos Aspectos de Una Vieja Enfermedad. Lima: A.F.A. Editores Importadores; 1998.
- Psarros G, Riddell J, Gandhi T, et al. Bartonella henselae infections in solid organ transplant recipients: report of 5 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2012;91:111-21.
- Guptill L. Bartonellosis. Vet Microbiol 2010;140:347-59.
- Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of Bartonella spp. Clin Microbiol Rev 2012;25:42-78.
- Pitassi LH, Cintra ML, Ferreira MR, et al. Blood cell findings resembling Bartonella spp. Ultrastruct Pathol 2010;34:2-6.
- Magalhães RF, Pitassi LH, Salvadego M, et al. Bartonella henselae survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? Transfus Med 2008;18:287-91.
- Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. Transfusion 2009;49 Suppl 2:1S-29S.
- Ruiz J, Silva W, Pons MJ, et al. Long time survival of Bartonella bacilliformis in blood stored at 4°C. A risk for blood transfusions. Blood Transfus 2012;10:563-4.
- Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev 2005;18:195-204.
- Whitaker BI, Hinkins S. The 2011 National Blood Collection and Utilization Report. Rockville (MD): U.S. Department of Health and Human Services; 2011.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Caderno de informação: sangue e hemoderivados; 2014.
- McDonald CP. Bacterial risk reduction by improved donor arm disinfection, diversion and bacterial screening. Transfus Med 2006;16:381-96.
- Lin JW, Chen CM, Chang CC. Unknown fever and back pain caused by Bartonella henselae in a veterinarian after a needle puncture: a case report and literature review. Vector Borne Zoonotic Dis 2011;11:589-91.
- Oliveira AM, Maggi RG, Woods CW, et al. Suspected needle stick transmission of Bartonella vinsonii subspecies berkhoffii to a veterinarian. J Vet Intern Med 2010;24:1229-32.
- Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, et al. Canine bartonelosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with Bartonella henselae and Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii. Vet Res 2007;38:697-710.
- Kawasato KH, de Oliveira LC, Velho PE, et al. Detection of Bartonella henselae DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2013;55:1-6.
- Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, et al. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2010;20:8-30.
- Stramer SL. Current perspectives in transfusion-transmitted infectious diseases: emerging and re-emerging infections. ISBT Sci Ser 2014;9:30-6.
- McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, et al. Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. Transfusion 2000;40:274-84.
- Kordick DL, Breitschwerdt EB. Relapsing bacteremia after blood transmission of Bartonella henselae to cats. Am J Vet Res 1997;58:492-7. ■

4.2 Capítulo II (artigo enviado para publicação)

Infecção aguda e tardia de *Bartonella henselae* em modelo animal

Marilene Neves da Silva^a, Gislaine Vieira-Damiani^{a,b}, Marna Elise Ericson^c, Kalpna Gupta^d, Amanda Roberta Almeida^a, Marina Rovani Drummond^a, Tania Cristina Benetti Soares^a, Bruno Grosseli Lania^a, Rovilson Gilioli^e, Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho^a

^a Departamento de Medicina, Divisão de Dermatologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), São Paulo, Brasil.

^b Departamento de Ciência e Tecnologia, Instituto Federal de Educação, Paraná, Brasil

^c Department of Dermatology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN, USA

^d Department of Medicine, Division of Hematology, Oncology and Transplantation, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN, USA

^e Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

Apoio Financeiro

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Projeto 2012 / 22340-5)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PVE 2042/2012)
- National Institutes of Health (UO1 HL117664).

Correspondência para Marilene Neves da Silva

Departamento de Clínica Médica (Dermatologia), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Rua Tessália Vieira de Camargo, n.126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13.081-970, Campinas, SP, Brasil. Fone: 55-19-3521-9132

E-mail: mnsilva31@gmail.com

Resumo

As *Bartonella* spp. são bactérias emergentes e negligenciadas com distribuição universal. São capazes de causar infecção por vezes prolongada com diversas manifestações clínicas e são potencialmente fatais. As doenças mais conhecidas são a bartonelose peruana, a doença da arranhadura do gato, a febre das trincheiras, a angiomatose bacilar e a endocardite. A *Bartonella henselae* é a principal espécie que causa doença em humanos. Com o objetivo de estudar a infecção aguda e tardia por *Bartonella*, camundongos BALB/c foram inoculados intraperitonealmente com uma suspensão de *Bartonella henselae* a fim de avaliar a infecção na corrente sanguínea, no fígado, no baço e na pele. As amostras foram analisadas após 4 e 21 dias de infecção, com testes moleculares e microscopia confocal. Os resultados demonstraram que a ocorrência de infecção em órgãos precede a infecção no sangue. Este estudo translacional mostra que resultados moleculares negativos no sangue não excluem a possibilidade de infecção por *B. henselae* em camundongos. A manifestação tardia da infecção no sangue pode ser um outro desafio para o diagnóstico, particularmente precoce, da infecção por *Bartonella henselae*.

As *Bartonella* spp. são agentes patogênicos re-emergentes e negligenciados que têm sido associados com uma ampla gama de doenças humanas. Elas causam a doença da arranhadura do gato (DAG) com características clínicas inespecíficas, geralmente auto-limitada, em casos raros, as manifestações da DAG incluem endocardite infecciosa e abscessos hepatoesplênicos (1). Além disso, *Bartonella* spp. podem causar infecção crônica ou até mesmo fatal (2). A bacteremia cíclica é uma marca na infecção em gatos e também pode ocorrer em humanos, como é observado na febre das trincheiras (3). O diagnóstico de bartonelose ainda é um grande desafio (4) e a *B. henselae* pode levar a uma variedade de manifestações, incluindo bacteremia e endocardite (5).

Harms e Dehio (5) mencionaram em sua revisão que "após inoculação as bartonelas

não são capazes de colonizar diretamente os eritrócitos". Parece haver a necessidade de infecção de um nicho primário para uma posterior infecção sanguínea. Em outro estudo, a infecção aguda de *Bartonella birtlesii* por via intravenosa em camundongo BALB/c, foi observada no fígado, baço e rim sete dias após a inoculação. O sangue permaneceu negativo até o sétimo dia, o último dia em que foi avaliado (6).

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de *Bartonella henselae* no sangue, pele, fígado e baço na infecção aguda e tardia em camundongos BALB / c.

O experimento foi realizado utilizando 16 camundongos isogênicos BALB/c fêmeas, com oito semanas de idade e peso entre 20 e 22 gramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (n = 8), o grupo controle e o grupo infectado. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados após 4 e 21 dias pós-infecção. A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas aprovou todos os protocolos experimentais (2847-1) antes da realização do estudo.

A suspensão bacteriana foi preparada usando *B. henselae* (Houston 1, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, ATCC 49882T) com 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) / ml em solução salina.

Foram infectados oito camundongos por infecção intraperitoneal de 30 µl da suspensão de *B. henselae* (10^4 UFC), no dia zero do experimento. Foi inoculado o mesmo volume de solução salina estéril em outros oito camundongos (grupo de controle).

Após 4 e 21 dias da inoculação experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de sangue por punção intracardíaca e também amostras de pele, baço e fígado tanto dos camundongos infectados quanto dos camundongos controle.

Para a extração do DNA, foi utilizado o *kit* comercial RTP Bacteria Mini Kit Stratec Molecular, conforme as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi submetido a PCR para um gene constitutivo, o GAPDH, uma enzima que está relacionada com a glicólise e é expressa em todas as células de mamíferos, como o objetivo de verificar a qualidade do DNA

extraído além da certificação da inexistência de inibidores de amplificação. Em seguida, foi realizado PCR convencional, específica para o gênero *Bartonella*, com amplificação da região intergênica 16S-23S do rRNA (7). Também foi realizado a PCR de dupla amplificação espécie-específica para *B. henselae* que tem como alvo a região que codifica a proteína FtsZ, envolvida na divisão celular da bactéria (8). Para prevenir contaminações, seguiram-se as técnicas descritas por Pitassi e colaboradores (9).

Para a microscopia confocal, amostras de pele, fígado e baço foram fixadas em 4% de formalina tamponada com fosfato salino durante 24 horas imediatamente após a eutanásia. As amostras fixadas foram desidratadas em etanol, solvidas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Foram montadas dez lâminas de poli-L-lisina-revestidas (Sigma; St Louis, MO) com séries consecutivas de secções de micrótomo com 6- μ m de espessura de cada amostra. Após desparafinização e hidratação em um gradiente de álcool/água, as lâminas foram submetidas a recuperação de antígenos por imersão em tampão de citrato (pH 6,0) e aquecimento em micro-ondas na potência máxima durante um minuto à potência média durante nove minutos. As lâminas foram lavadas em PBS (pH 7.2). Depois de uma fase de bloqueio em 10% de soro de cabra e soro de burro, as amostras foram incubadas com anticorpos primários monoclonal de *B. henselae* a uma diluição de 1: 100 (Abcam, ab704-250) e de cabra anti-colágeno tipo IV, diluição de 1:50 (Southern Biotech) durante a noite. Seguiu-se incubação com anticorpos secundários anti-rato, Alexa 555 Fluor® (Abcam, AB 150118), produzidos em cabra (1:1000) e anti-cabra DyLight® 650 (IgG H & L, AB 96934), produzidos em burro (1:100). As lâminas foram montadas em Vectashield® (Vector Labs) e observadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 II.

A sensibilidade da reação foi detectada a partir do número de cópias da sequência alvo. A sensibilidade na PCR convencional foi de 50 cópias e na PCR de dupla amplificação foi de 10 cópias. Os testes moleculares de baço, fígado e pele foram positivos quatro dias após infecção experimental em algumas amostras, porém negativas nas amostras sanguíneas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do diagnóstico das técnicas moleculares e de microscopia confocal usadas para detectar a infecção por *Bartonella henselae*

		4 dias	21 dias	4 dias	21 dias
		Controles (IP)*†		Infectados (IP)*†	
PCR Convencional	Sangue	0/4	0/4	0/4	0/4
	Pele	0/4	0/4	0/4	0/4
	Fígado	0/4	0/4	0/4	0/4
	Baço	0/4	0/4	0/4	0/4
PCR <i>nested</i>	Sangue	0/4	0/4	0/4	4/4
	Pele	0/4	0/4	1/4	0/4
	Fígado	0/4	0/4	1/4	0/4
	Baço	0/4	0/4	2/4	0/4
Microscopia Confocal	Sangue	0/4	0/4	0/4	0/4
	Pele	0/4	0/4	0/4	1/4
	Fígado	0/4	0/4	0/4	0/4
	Baço	0/4	0/4	0/4	0/4

* Número de amostras positivas/total de amostras † IP: Intraperitoneal

As amostras de sangue de todos os camundongos foram positivas para PCR após 21 dias de inoculação com *B. henselae*. Na microscopia confocal, de quatro animais infectados, uma amostra de pele foi positiva após 21 dias de infecção (Figura 1).

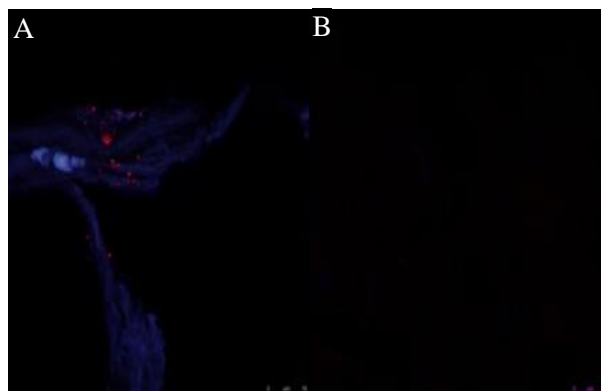


Figura 1: A microscopia confocal demonstra imunorreatividade para *B. henselae* (cor vermelha) e colágeno IV (cor azul) a partir de pele de camundongo infectado (A). A imagem B é de um controle negativo (pele de camundongo não infectado).

Karem *et al* (10) utilizaram modelo BALB/c para infecção intraperitoneal por *B. henselae*. Os pesquisadores acompanharam os animais durante sete dias e não conseguiram detectar infecção da corrente sanguínea. Amostras de fígado, baço, rim e linfonodos mesentéricos foram positivas a partir de 72h até sete dias após a infecção experimental. Em um estudo anterior, encontramos resultados semelhantes, após a infecção de *B. henselae* por transfusão sanguínea, a infecção da corrente sanguínea não pode ser detectada antes de 7 dias (11). O objetivo do presente estudo foi acompanhar camundongos BALB/c infectados com quatro e 21 dias de infecção e os resultados confirmam que a detecção de *B. henselae* no sangue aconteceu depois de um período mais longo da infecção, quando fígado e baço já estavam negativos.

Sabe-se que após a infecção sanguínea, as *Bartonella* spp. são capazes de definir um novo nicho, provavelmente relacionado a sua diversidade genômica (12) e as características do hospedeiro (13). As *Bartonella* spp. podem infectar válvulas cardíacas (como na endocardite provocada por *B. henselae* e *B. quintana*), fígado e baço (angiomatose bacilar e/ou peliose, causada por *B. henselae*), pele (como na verruga peruana causada por *Bartonella bacilliformis* e angiomatose bacilar causada por *B. henselae* e *B. quintana*) (14), etc. É provável que o microambiente de órgãos como baço e fígado forneçam um nicho para a multiplicação das bactérias. Subsequentemente, elas seriam dispersas na corrente sanguínea numa quantidade relativamente maior, tornando-se assim possível sua detecção.

Em conclusão, os resultados apresentados demonstram que foi possível detectar *B.*

henselae na corrente sanguínea dos hospedeiros infectados experimentalmente, mas isto ocorreu tardiamente após a inoculação intraperitoneal.

O número de cópias de DNA no sangue foi baixo, mesmo após 21 dias de infecção experimental, pois apenas as PCR de dupla amplificação foram positivas.

Os resultados deste estudo translacional reforçam que o diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp. continua a ser um desafio e que os métodos moleculares não têm sensibilidade suficiente para detectar baixo número de cópias das bactérias. O uso de técnicas mais sensíveis deve ser utilizado para minimizar o impacto destas limitações.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (Lactad) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) por sua assistência com a análise de microscopia confocal. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (2012 / 22340-5), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PVE 2042/2012) e ao National Institutes of Health (U01 HL117664).

Referências

1. Shasha, D, Gilon D, Vernea F, Moses AE, Strahilevitz J. 2014. Visceral cat scratch disease with endocarditis in an immunocompetent adult: a case report and review of the literature. *Vector Borne Zoonotic Dis* 4:175-81. <http://doi.org/10.1089/vbz.2012.1279>.
2. Liu MF, Cescau S, Mechold U, Wang J, Cohen D, Danchin A, Boulouis HJ, Biville F. 2012. Identification of a novel nanoRNase in *Bartonella*. *Microbiology* 158:886-95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262096>.
3. Siciliano RF, Castelli JB, Mansur AJ, Pereira dos Santos F, Colombo S, do Nascimento EM, Paddock CD, Brasil RA, Velho PE, Drummond MR, Grinberg M, Strabelli TM.

2015. *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii* Associated with Community-Acquired, Culture-Negative Endocarditis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 21(8), 1429–1432.

<http://doi.org/10.3201/eid2108.140343>

4. Chomel BB, Kasten RW, Williams C, Wey AC, Henn JB, Maggi R, Carrasco S, Mazet J, Boulouis HJ, Maillard R, Breitschwerdt EB. 2009. *Bartonella* endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients. *Ann N Y Acad Sci* 1166: 120-6.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538271> .

5. Harms A, Dehio C. 2012. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev* 25:42-78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232371> .

6. Deng HK, Le Rhun D, Lecuelle B, Le Naour E, Vayssier-Taussat M. 2012. Role of the spleen in *Bartonella* spp. infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:143-5.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098417> .

7. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, Breitschwerdt EB. 2007. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res* 38:697-710. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583666> .

8. Kawasato KH, de Oliveira LC, Velho PE, Yamamoto L, Del Negro GM, Okay TS. 2013. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55: 1-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328718> .

9. Pitassi LH, de Paiva Diniz PP, Scorpio DG, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, Gilioli R, Colombo S, Sowry S, Breitschwerdt EB, Nicholson WL, Velho PE. 2015. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, 9 (1), e0003467. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003467> .

10. Karem, K. L., Dubois, K. A., McGill, S. L., & Regnery, R. L. 1999. Characterization of *Bartonella henselae*-specific immunity in BALB/c mice. *Immunology* 97(2), 352–

358.<http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00750.x>

11. Silva MN, Vieira-Damiani G, Ericson ME, Gupta K, Gilioli R, de Almeida AR, Drummond MR, Lania BG, de Almeida Lins K, Soares TC, Velho PE. 2016. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. Transfusion 56:1556-9
ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968530.
12. Minnick MF, Battisti JM. 2009. Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. Future Microbiol 4:743-58.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19659429> .
13. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, Koehler JE, Dehio C. 2009. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet Res 40: 29.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19284965> .
14. Chian CA, Arrese JE, Piérard GE. 2002. Skin manifestations of *Bartonella* infections. Int J Dermatol 1:461 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207759>

5 Discussão Geral

Nas últimas décadas o espectro de manifestações clínicas das bartoneloses aumentou substancialmente e sabe-se que elas são potencialmente fatais, principalmente em pacientes imunodeficientes.^{12; 46} Populações de menor visibilidade e baixo poder econômico são supostamente mais afetadas, considerando que estejam mais sujeitas aos ectoparasitas envolvidos na transmissão das *Bartonella* spp..

Embora elas não sejam de fato doenças novas, mas re-emergentes, são frequentemente negligenciadas pelos profissionais da saúde e pesquisadores. A infecção pode ser assintomática, mas pode ser que tenha impacto na morbidade em pacientes com outras doenças, por exemplo, reações hansênicas subentrantes, crises de falcização e hepatite “criptogenica”.¹¹

O diagnóstico é desafiador não apenas porque os clínicos não consideram a hipótese de bartelose em muitos casos chamados de idiopáticos, mas também pelas limitações técnico-laboratoriais próprias do diagnóstico da infecção por estas bactérias.¹¹ Os dois trabalhos apresentados nos capítulos I e II reforçam esta última consideração. Com quatro dias da infecção experimental via intraperitoneal os camundongos não tinham infecção sanguínea detectável pela PCR, mesmo de dupla amplificação.

As *Bartonella* spp. são as únicas bactérias conhecidas que podem viver no interior das hemácias e são capazes de induzir infecção assintomática nos hospedeiros, como observado nos períodos entre as crises de febre das trincheiras ou entre a febre de Oroya e a verruga peruana.^{12;46} Estudos da história natural sobre estas bactérias sugerem que estas se adaptaram aos reservatórios mamíferos, causando infecções intra-eritrocitária crônicas, desencadeando uma bacteremia em até 50% da população dos reservatórios. Esta bacteremia é a fonte de infecção do vetor.⁴⁷

Mas a infecção pelas *Bartonella* spp. também pode causar doenças agudas e crônicas. A diversidade de manifestações clínicas relatadas é dependente das espécies

infectantes destas bactérias e do estado imunitário do paciente. O papel dos vetores na ativação dos agentes e potencial implicação clínica é desconhecido. Infecções por *Bartonella* spp. são um desafio ao tratamento por causa da persistência da infecção. Recaídas frequentes ocorrem devido à existência de uma fase intra-eritrocitária que fornece um nicho de proteção para as bactérias. Infelizmente, não há revisões sistemáticas disponíveis que resumam e validem decisões de tratamento para infecções por *Bartonella* spp.. Até à presente data, apenas dois ensaios clínicos randomizados foram relatados para o tratamento de *Bartonella* spp.. Um desses estudos avaliou pacientes com doença da arranhadura do gato⁴⁸ e o outro estudo avaliou pacientes adultos com bacteremia crônica causada por *B. quintana*.⁴⁹ Estudos clínicos randomizados bem desenhados são necessários para comparar diferentes opções para o tratamento da infecção pelas *Bartonella* spp..¹⁰ Contudo, como demonstrado pelos resultados apresentados nesta tese, sem testes diagnósticos mais sensíveis, estes estudos podem levar a conclusões equivocadas, já que podem haver falsos- negativos determinados por baixa bacteremia e não por erradicação da infecção.

Dentre as espécies de *Bartonella*, a *B. henselae* é considerada o agente mais comumente envolvido e o mais relevante como causa de infecção humana.^{14; 50; 51} Esta espécie causa tipicamente infecção autolimitada, como ocorre na doença da arranhadura do gato, mas pode causar bacteremia assintomática em seres humanos, tendo sido isolada em 1,2% dos 500 doadores de sangue avaliados no Hemocentro da Unicamp.⁵ Em um recente editorial do *Transfusion* (anexo III) Eder,⁵² citando o trabalho do Capítulo I, reconhece a importância deste estudo e ressalta que inevitavelmente percepções entre o conhecido e o desconhecido continuará a evoluir a medida em que novas informações sobre os riscos emergentes e potenciais tornam-se disponíveis, para, finalmente, avançar a segurança e proteção de pacientes transfundidos.

Qualquer infecção com uma fase de bacteremia assintomática tem o potencial de transmissão por transfusão. A sobrevivência do agente infeccioso no sangue coletado e a sua capacidade de causar infecção por via intravenosa, também são fatores necessários para a transmissão por essa via.^{53; 54} Estima-se que bacteremia por *Bartonella* spp. em indivíduos assintomáticos seja de aproximadamente 1-10 UFC/ μ l de sangue, o que pode estar abaixo do limite de detecção da maioria dos ensaios de PCR convencionais, de dupla amplificação ou mesmo reação em tempo real.⁵⁵

O aspecto translacional dos estudos pode ser exemplificado pelo caso de um homem de 62 anos com dois meses de história de febre, tosse, falta de ar e perda de 15% do peso atendido no Hospital de Clínicas da Unicamp. Ele referia contato com gatos na infância e com cães durante toda a vida, chegando a ter 12 animais em casa em uma única ocasião, e que, muitas vezes os animais apresentavam infestação por pulgas e carrapatos. Ele estava bastante descorado e dispneico, mas não apresentava linfonomegalias, visceromegalias ou nenhum outro achado relevante no exame físico. Os exames complementares evidenciaram anemia grave que exigiu transfusões sanguíneas. Não foram identificados focos infecciosos. As hemoculturas coletadas foram todas negativas. Infecção por micobactérias foi descartada. O paciente apresentou piora progressiva e, após 40 dias, recebendo antibioterapia com amoxicilina, clavulanato, piperacilina e tazobactam, foi solicitada a investigação microbiológica e molecular para bartonelose e iniciado tratamento com imipenem, cloranfenicol, gentamicina e ceftriaxone. Isto aconteceu dois dias antes do óbito. PCR convencional gênero-específica para a região ITS e PCR de amplificação dupla espécie-específica para a região *FtsZ* foram negativas na amostra de sangue total. Aliquota do sangue foi cultivada em meio líquido de enriquecimento e, após 14 dias, semeada em meio sólido com 30% de sangue de carneiro. As mesmas reações moleculares foram realizadas a partir do DNA extraído da amostra de cultura líquida. Apenas a PCR de dupla amplificação foi positiva nesta amostra. Obteve-se colônias bacterianas sugestivas de bartonela.

Deste material, as duas reações foram positivas e o sequenciamento evidenciou tratar-se de *B. henselae*, como sugerido pela positividade da reação espécie-específica. (dados não publicados)

A baixa bacteremia já foi documentada em um estudo experimental com gatas prenhes. Estas foram infectadas com *B. henselae* durante a gestação e a baixa bacteremia foi evidenciada na prole após o nascimento.⁵⁶

A ocorrência de reação transfusional por contaminação bacteriana, assumiu papel de destaque na medicina transfusional atual. Presume-se que contaminação por bactérias gram-negativas a partir de doadores assintomáticos com bacteremia transitória seja responsável pela maioria dos casos de contaminação.⁵⁷ Um estudo demonstrou que um dos principais agentes causadores de complicações sépticas graves em concentrados de hemácias são estas bactérias.⁵⁴

As *Bartonella* spp. têm capacidade de causar infecção crônica subclínica. Por ser fastidiosa, as manifestações de bartoneloses em um paciente transfundido com sangue infectado com *Bartonella* sp. pode ocorrer muito mais tarde e, portanto, não ser associada à transfusão. Estes dados sugerem que potenciais transmissões desta bactéria por transfusão sejam subdiagnosticados.

Antes de 1993, as *Bartonella* spp. nunca haviam sido associadas à endocardite em animais ou humanos.⁵⁸ Hoje se sabe que elas são uma das causas mais importantes de endocardite em pacientes com hemocultura-negativa.⁵⁹ Os agentes mais comuns de endocardite por *Bartonella* são *B. quintana* e *B. henselae*.⁶⁰ No entanto, casos esporádicos de endocardite também têm sido associados com *B. koehlerae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*,

B. vinsonii subsp. *arupensis*, *B. elizabethae* e *B. alsatica*.⁶¹ Candidatus *B. mayotimonensis* foi recentemente identificado na válvula aórtica de um paciente com endocardite infecciosa nos EUA.⁶² Os pacientes com endocardite por estas bactérias tendem a ter doenças valvares pré-existent e 90% destes necessitam de cirurgia valvar.⁶³

O campo de pesquisa de *Bartonella* spp. ainda é novo e rico em perguntas, para as quais as respostas dos pacientes são relevantes e extremamente necessárias. Com base na compreensão evolutiva da importância médica deste gênero de bactérias, investigação translacional tem o potencial de gerar benefícios substanciais para a saúde animal e humana. Com base em observações recentes, é possível que pesquisas com *Bartonella* spp. poderiam reduzir substancialmente o sofrimento animal e humano associado a processos de doenças debilitantes crônicas. Além disso, os resultados poderiam incluir economias expressivas para os pacientes, seguradoras, e para a sociedade. A investigação translacional sobre métodos diagnósticos mais sensíveis para a infecção por *Bartonella* spp. será muito benéfica.¹¹ O grupo que estuda as bartoneloses na Unicamp introduziu a possibilidade de transmissão transfusional das bartonelas. Isto foi reconhecido numa publicação do *Transfusion* sobre *Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety* em que Stramer *et al*³⁷ citam a publicação de Magalhães *et al*³⁶ como o pioneiro a considerar a *B. henselae* como passível de ser transmitida por via transfusional.

O estudo apresentado no Capítulo I desta tese detectou a infecção por *B. henselae* do tecido apenas na PCR de dupla amplificação, o que sugere baixa bacteremia, uma vez que a PCR *nested* é mais sensível que a PCR convencional. No sangue, contudo, a infecção não pode ser documentada. Evidenciou também que, em camundongos, assim como em gatos⁶⁴ a transmissão transfusional é possível. O estudo do capítulo I foi reconhecido pelo Editorial do *Transfusion* sobre *Knowns, unknowns, and perceptions in between* em que Eder⁵² cita a publicação como doença emergente e potencialmente transmitida pela transfusão sanguínea. A autora ressalta que, embora a transmissão transfusional ainda não tenha sido documentada em humanos, modelos animais, tais como, com gatos, e, agora, com camundongos, apontam o potencial risco.

Os resultados observados no Capítulo II reforçam que o diagnóstico laboratorial das bartoneloses é um desafio clínico. Este estudo translacional também documenta que resultados moleculares negativos no sangue, à semelhança de casos em humanos, não excluem a possibilidade de infecção por *B. henselae* em camundongos e que a infecção sanguínea detectável é tardia em relação a infecção de fígado e baço nestes animais. Uma vez que a infecção passa a ser sanguínea, na dependência provável de fatores do hospedeiro ou de características genéticas da própria espécie ou cepa infectante, manifestações clínicas distintas podem ocorrer. É provável que o microambiente de órgãos como fígado e baço possam favorecer a multiplicação das bactérias como sugere o estudo em questão e como se observa na angiomatose bacilar e peliose bacilar destes órgãos ou mesmo na hepatite graunolomatosa também causada pela *B. henselae*.

6 Conclusões

- A transmissão transfusional de *B. henselae* é possível em camundongos mesmo quando o animal doador tem infecção sanguínea indetectável.
- A detecção de *B. henselae* no sangue após a infecção intraperitoneal experimental em camundongos é tardia em relação à detecção esplênica e hepática nestes animais. A infecção sanguínea por *B. henselae* parece ser uma segunda etapa nesta infecção.
- Resultados moleculares negativos no sangue não excluem a possibilidade de infecção por *B. henselae* em camundongos.
- O estudo em modelo animal da infecção por *B. henselae* reforça a necessidade de novos estudos em humanos para reavaliação dos riscos e do impacto da transmissão da bactéria por via transfusional.

7 Referências

- 1 GUIMARÃES, R. Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina. Translational research: an interpretation. *Ciênc. saúde coletiva*, v. 18, n. 6, p. 1731-1744, 06/2013 2013. ISSN 1413-8123. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1413-81232013000600024&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.
- 2 CARNIO, E.C. Translational research and nursing. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto , v. 20, n. 6, p. 1013, Dec. 2012 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692012000600001&lng=en&nrm=iso>.
- 3 PADILHA, M. I.; CATARINA, U. F. D. S. Translational research: what is its importance to nursing practice? *Texto contexto - enferm.*, v. 20, n. 3, p. 419-424, 09/2011 2011. ISSN 0104- 0707. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0104-07072011000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt >.
- 4 WOODS, N. F.; MAGYARY, D. L. Translational research: why nursing's interdisciplinary collaboration is essential. *Res Theory Nurs Pract*, v. 24, n. 1, p. 9-24, 2010. ISSN 1541-6577 (Print)1541-6577. Disponível em: < <http://dx.doi.org/>>.
- 5 PITASSI, L. H. et al. Bartonella spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 1, p. e0003467, Jan 2015. ISSN 1935-2727. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003467>>.
- 6 ANGELAKIS, E. et al. Bartonella henselae in skin biopsy specimens of patients with cat-scratch disease. *Emerg Infect Dis*, v. 16, n. 12, p. 1963-5, Dec 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122232>>.
- 7 LIU, J. et al. Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *J Clin Microbiol*, v. 54, n. 1, p. 49-58, Jan 2016. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02257-15>>.
- 8 DUNCAN, A. W.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. A combined approach for the enhanced detection and isolation of Bartonella species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. *J Microbiol Methods*, v. 69, n. 2, p. 273-81, May 2007. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346836>>.
- 9 BOULLOUIS, H. J. et al. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections. *Vet Res*, v. 36, n. 3, p. 383-410, 2005 May-Jun 2005. ISSN 0928-4249. Disponível

em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845231> >.

- 10 ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. *Int J Antimicrob Agents*, v. 44, n. 1, p. 16-25, Jul 2014. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006> >.
- 11 BREITSCHWERDT, E. B. Bartonellosis: one health perspectives for an emerging infectious disease. *Ilar j*, v. 55, n. 1, p. 46-58, 2014. ISSN 1084-2020. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/ilar/ilu015> >.
- 12 MAGUINA, C.; GUERRA, H.; VENTOSILLA, P. Bartonellosis. *Clin Dermatol*, v. 27, n. 3, p. 271-80, May-Jun 2009. ISSN 0738-081x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.10.006> >.
- 13 CHOMEL, B. B. et al. Experimental transmission of Bartonella henselae by the cat flea. *J Clin Microbiol*, v. 34, n. 8, p. 1952-6, Aug 1996. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8818889> >.
- 14 HARMS, A.; DEHIO, C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of Bartonella spp. *Clin Microbiol Rev*, v. 25, n. 1, p. 42-78, Jan 2012. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232371> >.
- 15 DEHIO, C. Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, v. 58, p. 365-90, 2004. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15487942> >.
- 16 CESARIO M, C. R. Infecção bacteriana rumo ao Brasil. *Scientific American Brasil*, 2016. Disponível em: < http://www.pragas.com.br/noticias/destaques/infeccao_bacteriana.php >.
- 17 SPACH, D. H. et al. Bartonella (Rochalimaea) quintana bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med*, v. 332, n. 7, p. 424-8, Feb 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7529895> >.
- 18 FOUCAULT, C.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Bartonella quintana characteristics and clinical management. *Emerg Infect Dis*, v. 12, n. 2, p. 217-23, Feb 2006. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16494745> >.
- 19 VELHO, P. E.; ERICSON, M. E. Cryptogenic hepatitis and bartonellosis. *Dig Dis Sci*, v. 57, n. 4, p. 1107-8, Apr 2012. ISSN 0163-2116. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-012-2065-z> >.
- 20 LAMAS, C. et al. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 3, p. 221-35, May 2008. ISSN 0074-0276(Print)0074-0276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 21 DA COSTA, P. S.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Antibodies to Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Coxiella burnetii, Bartonella henselae, Bartonella quintana, and Ehrlichia chaffeensis among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 853-9, Dec 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16444416> >.

- 22 TSAL, Y. L. et al. Bartonella species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v. 34, n. 4, p. 299-314, Jul 2011. ISSN 1878-1667. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21616536>>.
- 23 BILLETER, S. A. et al. Vector transmission of Bartonella species with emphasis on the potential for tick transmission. Med Vet Entomol, v. 22, n. 1, p. 1-15, Mar 2008. ISSN 0269-283X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380649>>.
- 24 KERNIF, T. et al. Acquisition and excretion of Bartonella quintana by the cat flea, Ctenocephalides felis felis. Mol Ecol, v. 23, n. 5, p. 1204-12, Mar 2014. ISSN 1365-294X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24400877>>.
- 25 REIS, C. et al. Vector competence of the tick Ixodes ricinus for transmission of Bartonella birtlesii. PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 5, p. e1186, 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655306>>.
- 26 HENRIQUEZ-CAMACHO, C. et al. Proteins of Bartonella bacilliformis: Candidates for Vaccine Development. Int J Pept, v. 2015, 2015. ISSN 1687-9767 (Print)1687-9775 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2015/702784>>.
- 27 BREITSCHWERDT, E. B. et al. Molecular evidence of perinatal transmission of Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and Bartonella henselae to a child. J Clin Microbiol, v. 48, n. 6, p. 2289-93, Jun 2010. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392912>>.
- 28 TUYA, X. L. et al. Possible vertical transmission of Bartonella bacilliformis in Peru. Am J Trop Med Hyg, v. 92, n. 1, p. 126-8, Jan 2015. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371184>>.
- 29 VELHO, P. E. N. F; DRUMMOND, M. R. et al. Bartonella henselae AS A PUTATIVE CAUSE OF CONGENITAL CHOLESTASIS. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 58 2016.
- 30 OLIVEIRA, A. M. et al. Suspected needle stick transmission of Bartonella vinsonii subspecies berkhoffii to a veterinarian. J Vet Intern Med, v. 24, n. 5, p. 1229-32, 2010 Sep-Oct 2010. ISSN 0891-6640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20695992>>.
- 31 LIN, J. W.; CHEN, C. M.; CHANG, C. C. Unknown fever and back pain caused by Bartonella henselae in a veterinarian after a needle puncture: a case report and literature review. Vector Borne Zoonotic Dis, v. 11, n. 5, p. 589-91, May 2011. ISSN 1557-7759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569013>>.
- 32 PSARROS, G. et al. Bartonella henselae infections in solid organ transplant recipients: report of 5 cases and review of the literature. Medicine (Baltimore), v. 91, n. 2, p. 111-21, Mar 2012. ISSN 0025-7974. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0b013e31824dc07a>>.
- 33 BOULOUIS, H. J. et al. Kinetics of Bartonella birtlesii infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions. Infect Immun, v. 69, n. 9, p. 5313-7, Sep 2001. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500400>>.

- 34 PACHAS-CHÁVEZ, P. Enfermedad de Carrión (bartonelosis) en el Perú. Oficina General de Epidemiología 2001.
- 35 ABBOTT, R. C. et al. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 20, n. 1, p. 41-51, Jan 1997. ISSN 0147-9571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023040> >.
- 36 MAGALHÃES, R. F. et al. *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cell units: is it transmissible by transfusion? *Transfus Med*, v. 18, n. 5, p. 287-91, Oct 2008. ISSN 1365-3148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937735> >.
- 37 STRAMER, S. L. Current perspectives in transfusion-transmitted infectious diseases: emerging and re-emerging infections. *ISBT Sci Ser*, v. 9, n. 1, p. 30-36, Jul 2014. ISSN 1751-2816 (Print)1751-2816. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/voxs.12070> >.
- 38 PENNISI, M. G. et al. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Res Vet Sci*, v. 88, n. 3, p. 379-84, Jun 2010. ISSN 1532-2661. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963231> >.
- 39 DRUMMOND, M. R.; VELHO, P. E. N. F. Molecular and microbiological detection of *Bartonella* spp. bacteremia in cats. 20-08-2012 2012. Disponível em: < <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000878411> >.
- 40 DRUMMOND, M. R.; GILIOLI, R.; VELHO, P. E. Bartonellosis diagnosis requires careful evaluation. *Braz J Infect Dis*, v. 14, n. 3, p. 217, May-Jun 2010. ISSN 1413-8670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 41 APFALTER, P.; REISCHL, U.; HAMMERSCHLAG, M. R. In-House Nucleic Acid Amplification Assays in Research: How Much Quality Control Is Needed before One Can Rely upon the Results? , 2005-12-01 2005. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/content/43/12/5835> >.
- 42 GUPTILL, L. Bartonellosis. *Vet Microbiol*, v. 140, n. 3-4, p. 347-59, Jan 27 2010. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.011> >.
- 43 DINIZ, P. P. et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res*, v. 38, n. 5, p. 697-710, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 0928-4249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583666> >.
- 44 KAWASATO, K. H. et al. Detection of *Bartonella henselae* DNA in clinical samples including peripheral blood of immune competent and immune compromised patients by three nested amplifications. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 55, n. 1, p. 1-6, 2013 Jan-Feb 2013. ISSN 1678-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328718> >.
- 45 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: 2010.
- 46 MAGALHAES, R. F. et al. Bartonellosis as cause of death after red blood cell unit transfusion. *Ultrastruct Pathol*, v. 33, n. 4, p. 151-4, Jul-Aug 2009. ISSN 0191-3123. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/01913120902785567> >.

- 47 BROUQUI, P. et al. Chronic Bartonella quintana bacteremia in homeless patients. N Engl J Med, v. 340, n. 3, p. 184-9, Jan 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9895398>>.
- 48 BASS, J. W. et al. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. Pediatr Infect Dis J, v. 17, n. 6, p. 447-52, Jun 1998. ISSN 0891-3668 (Print)0891-3668. Disponível em: < <http://dx.doi.org/>>.
- 49 FOUCAULT, C.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Randomized open trial of gentamicin and doxycycline for eradication of Bartonella quintana from blood in patients with chronic bacteremia. Antimicrob Agents Chemother, v. 47, n. 7, p. 2204-7, Jul 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821469>>.
- 50 KOSOY, M.; HAYMAN, D. T.; CHAN, K. S. Bartonella bacteria in nature: where does population variability end and a species start? Infect Genet Evol, v. 12, n. 5, p. 894-904, Jul 2012. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449771>>.
- 51 MOSEPELE, M.; MAZO, D.; COHN, J. Bartonella infection in immunocompromised hosts: immunology of vascular infection and vasoproliferation. Clin Dev Immunol, v. 2012, p. 612809, 2012. ISSN 1740-2530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22162717>>.
- 52 EDER, A. F.; GEORGETOWN UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE BLOOD SERVICES SECTION, D. O. T. M. W. D. Knowns, unknowns, and perceptions in between. Transfusion, v. 56, n. 6pt2, p. 1491-1495, 2016. ISSN 1537-2995. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.13668/pdf>>.
- 53 GREUB, G.; RAOULT, D. Bartonella: new explanations for old diseases. J Med Microbiol, v. 51, n. 11, p. 915-23, Nov 2002. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448674>>.
- 54 TEIXEIRA, M. P. et al. Prevenção e controle da contaminação bacteriana de hemocomponentes. O, 2012-03-16 2012. Disponível em: < <http://www.seer.ufsj.edu.br/index.php/recom/article/view/115>>.
- 55 BREITSCHWERDT, E. B. et al. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), v. 20, n. 1, p. 8-30, Feb 2010. ISSN 1476-4431. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x>>.
- 56 FLEISCHMAN, D. A. E. A. Impact of queen infection on kitten susceptibility to different strains of Bartonella henselae. v. 180, n. Issues 3-4, p. 268-272, 18 November 2015 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.09.020>>.
- 57 BRECHER, M. E.; HAY, S. N. Bacterial contamination of blood components. Clin Microbiol Rev, v. 18, n. 1, p. 195-204, Jan 2005. ISSN 0893-8512 (Print)0893-8512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.18.1.195-204.2005>>.
- 58 CHOMEL, B. B. et al. Bartonella endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and

patients. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1166, p. 120-6, May 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538271> >.

- 59 LAMAS, C. et al. Bartonella native valve endocarditis: the first Brazilian case alive and well. *Braz J Infect Dis*, v. 11, n. 6, p. 591-4, Dec 2007. ISSN 1413-8670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18327472> >.
- 60 DREIERA, J. et al. Culture-negative infectious endocarditis caused by Bartonella spp.: 2 case reports and a review of the literature. v. 61, n. 4, p. 476–483, August 2008 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.008> >.
- 61 RAOULT, D. et al. First isolation of Bartonella alsatica from a valve of a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol*, v. 44, n. 1, p. 278-9, Jan 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16390990> >.
- 62 LIN, E. Y. et al. Candidatus Bartonella mayotimonensis and endocarditis. *Emerg Infect Dis*, v. 16, n. 3, p. 500-3, Mar 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202430> >.
- 63 FOURNIER, P. E. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of Bartonella quintana and Bartonella henselae endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine (Baltimore)*, v. 80, n. 4, p. 245-51, Jul 2001. ISSN 0025-7974. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470985> >.
- 64 KORDICK, D. L. et al. Clinical and pathologic evaluation of chronic Bartonella henselae or Bartonella clarridgeiae infection in cats. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 5, p. 1536-47, May 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203518> >.

ANEXO I

Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais - Unicamp



CEUA/Unicamp

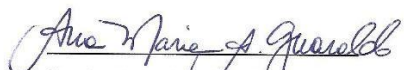
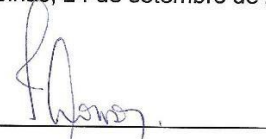
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Métodos não invasivos com maior sensibilidade para diagnóstico de infecção humana por Bartonella spp." (protocolo nº 2847-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho / Marilene Neves da Silva, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 24 de setembro de 2012.

Campinas, 24 de setembro de 2012.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente
Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO II

Carta Convite – *University of Minnesota.*

UNIVERSITY OF MINNESOTA

Twin Cities Campus

*Division of Hematology, Oncology and
Transplantation
Department of Medicine
Medical School*

*Mayo Mail Code 480
420 Delaware Street S.E.
Minneapolis, MN 55455
Office: 612-624-0123
Fax: 612-625-6919
www.dom.umn.edu/hot*

Minneapolis, October 15, 2013

Consulate General of the United States, São Paulo
Rua Henri Dunant, 500
Chácara Santo Antônio, São Paulo - SP, 04709-110

LETTER OF INVITATION FOR MARILENE NEVES DA SILVA

Dear American Consul,

I am the partnering Principal Investigator from USA with Dr Paulo Eduardo Velho, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo on a Science Without Borders grant of the Government of Brazil. We are trying to advance research on pain in Bartonella infection in Dr Velho's laboratory in UNICAMP using my laboratory's established expertise in pain. This entails my visit to UNICAMP to train and oversee the progress and also the visits of UNICAMP investigators and trainees to my laboratory in the University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA. I had a productive visit to UNICAMP in March/April 2013. Now Dr Marilene Neves da Silva a trainee from Dr Velho's laboratory at UNICAMP would visit my laboratory to get hands on training from my team at the University of Minnesota. Dr da Silva would require a VISA to the United States to visit my laboratory. I am providing my information to facilitate the requirements for her VISA application.

My complete name is Kalpna Gupta. My date of birth is June 29, 1958. My office address is University of Minnesota Medical School; MMC 480; Mayo Mail Code 480; 420 Delaware Street SE; Minneapolis, MN 55455 (telephone: 1-612-625-7648) and my home address is 7505 Hyde Park Drive, Edina, MN 55439 (telephone: 1-952-944-5655). I am an Associate Professor of Medicine at the University of Minnesota. I am a citizen of the United States.

Dr Marilene Neves da Silva, PhD student, is a graduate in nursing at the Integrated Colleges Einstein - Brazil. She was born on December 20, 1975, and lives at 42 Constantino Suriani Street in Campinas, SP, Brazil zip code 13043510 (telephone: 55 19 3521-9134). Dr da Silva will be training in setting up endothelial culture experiments and protocols for treatment and behavioral analysis of mice as the main goal of her doctorate training under Science without Borders Program.

I would be able to have her in my lab at the University of Minnesota for about 5 months, from February to June, 2014, to learn research techniques that will enable her to perform certain experiments back at UNICAMP upon her return. She will be training mainly on endothelial cell culture and pain behaviors in mice. The purpose of her visit is to implement this research technique at UNICAMP for the studies proposed under the Science without Borders grant. Dr da Silva's visit is in accordance with the timeline of the research project entitled "**Association of Bartonella Infection with Sickle Cell Disease**", a project approved and supported by CAPES. Dr da Silva will continue the training started when I visited Brazil in March, 2013, and initiated the research protocols/procedures. Moreover, Dr da Silva's visit will help keep a new interdisciplinary collaboration between the Division of Hematology, Oncology and Transplantation at the University of Minnesota and a well-

Page 2
August 15, 2013

established research group at the UNICAMP that has been studying sickle cell diseases for years.

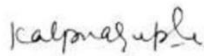
While in Minnesota she will not engage in any form of gainful employment. She will be supported by "Coordination for Higher Level Graduates Improvement" (CAPES), under the Science Without Borders program of Brazil (Project number: PVE035/2012), which aims to promote the consolidation and expansion of science, technology and innovation in Brazil by means of international exchange and mobility. My laboratory and/or the University of Minnesota will not be responsible for any of her expenses during this visit

During her time in Minnesota, Dr. da Silva will stay at University Inn, 925 4th Street SE, Minneapolis, MN 55414, close to the University within walking distance of my laboratory at Division of Hematology, Oncology and Transplantation, Department of Medicine.

I will appreciate if she is granted the necessary VISA to the United States. I will be glad to provide any further information required for Dr da Silva's visit to my laboratory.

With kind regards,

Sincerely,



Kalpna Gupta, PhD
Associate Professor
Division of Hematology, Oncology and Transplantation
Department of Medicine
MMC 480
420 Delaware Street SE
Minneapolis, MN 55455

Phone: [\(612\) 625-7648](tel:6126257648)
Fax: [\(612\) 625-6919](tel:6126256919)
gupta014@umn.edu

ANEXO III

EDITORIAL

Knowns, unknowns, and perceptions in between

"There are things known and there are things unknown, and in between are the doors of perception." Attributed to Aldous Huxley

This special themed issue of **TRANSFUSION** is a trip behind the thematic doors of blood donation and known and emerging threats to the safety of the blood supply. Within its pages are the perceptions that guide, sometimes mislead, but eventually direct scientific progress and inform blood safety policy and transfusion practice. The original articles, editorials, and a committee report have all followed the usual peer-review process for publication in **TRANSFUSION** but are being presented in this supplemental issue made possible by support from Grifols.

This year, a number of long-standing policies that govern blood donor eligibility in the United States are changing as the field continually assesses known risks of blood donation and transfusion and faces newly recognized transfusion-transmitted infections (TTIs). Articles in this volume confront perceptions about the change from a lifetime ban to a temporary deferral from blood donation for men who have sex with men (MSM), provide context to the shift in hemoglobin deferral policies, examine the barriers to donor recruitment and retention, offer insight into the uncertainty about the optimal approach to reduce the risk of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection (TT-CMV) in vulnerable patient populations, and tackle the perennial challenges of TTIs. The collection is organized behind six doors covering a broad spectrum of donation-related topics and transfusion complications, starting with the changes that affect donor screening this year and ending with innovative technology that holds promise for the future.

DOOR 1: SCREENING BLOOD DONORS FOR INFECTIOUS AND NONINFECTIOUS RISKS

Since September 1985, blood centers have asked prospective male donors about their history of sexual contact with another man even once since 1977 and have deferred those men based on their potentially higher risk of certain blood-borne viruses. This earliest precautionary measure at the advent of the acquired immuno-

deficiency syndrome (AIDS) crisis reduced the burden of infectious units entering the blood supply even before human immunodeficiency virus (HIV) was identified as its cause. The permanent disqualification for MSM was more stringent than the temporary deferrals imposed for other possible risk exposures, such as the 12-month deferral for women with HIV-infected sexual partners. The MSM policy persisted as a precaution, however, despite the institution of highly sensitive nucleic acid-based tests and overlapping antibody tests to screen blood donors for TTIs as well as robust computer systems and quality programs to control donor management and component disposition. After years of scrutiny over whether the MSM policy could be safely modified, US Food and Drug Administration (FDA) released final guidance in December 2015 that changes the MSM deferral from a lifetime ban to a 1-year deferral after the last sexual contact.¹

Although blood centers in the United States are now preparing to implement this change, experience is accumulating from other countries that have already shortened the length of their MSM deferral. This topic is the subject of two reports in this issue. O'Brien and colleagues have performed a careful assessment of post-implementation risk with a 5-year MSM deferral period in Canada.² Germain addresses concerns about the change by revisiting the predictions in models of perceived risk to the actual trends observed in Canada, Australia, and the United Kingdom that have transitioned to temporary MSM deferral periods.³ Both studies offer reassurance that shortening the deferral period does not negatively affect donor compliance with disclosing risk behavior or the rate of HIV-positive donations. Another contribution on the MSM topic is a cognitive evaluation of the AABB Uniform Donor History Questionnaire, which is used to screen most of the US blood supply. Willson and colleagues provide new information about how potential donors understand the questions and whether MSM interpret and respond to the questions differently than other donors.⁴ Their results show that all potential donors understand that the purpose of the questionnaire is to assess the safety of their blood for transfusion to others. They found no differences in how potential groups of donors (including MSM) understand and interpret the questions, and concluded that all donors answered the questions, even the potentially sensitive ones, as honestly as possible.

As one of the oldest donor screening policies changes, the newest AABB Blood Banking/Transfusion Medicine (BB/TS) standard for mitigating the risk of

doi:10.1111/trf.13668

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;56:1491–1495

EDITORIAL

transfusion-related acute lung injury (TRALI), the most common of the transfusion-related fatalities reported to the FDA, becomes effective on October 1, 2016. The standard now applies to apheresis platelets as well as plasma and whole blood for transfusion, and it reduces the likelihood that the components will contain human leukocyte antigen (HLA) Class I and Class II antibodies which can cause TRALI. To comply with the standard, accredited blood centers must collect apheresis platelets from males, females who have not been pregnant, and females who have had negative HLA antibody test results since their most recent pregnancy. Data from the American Red Cross presented in this issue suggest that the risk of TRALI from apheresis platelets might be reduced by 60% by selectively testing female donors who have had prior pregnancies and excluding those with positive results for HLA Class I and II antibodies.⁵

DOOR 2: STRATEGIES TO PROTECT BLOOD DONORS FROM IRON DEPLETION

Another significant change this year to one of the original donor screening policies, ostensibly to protect donors' health, is to the minimum hemoglobin (Hb) requirement for male donors. Since 1958, this cutoff has been set at 12.5 g/dL in the Code of Federal Regulations (CFR) for both men and women, but the threshold increases to 13.0 g/dL for men on May 23, 2016.⁶ Interestingly, the first edition of BB/TS standards in 1958 defined the Hb requirement for male donors as 13.5 g/dL, which changed to 13.0 g/dL in the 13th edition in 1989, then finally to 12.5 g/dL in the 14th edition in 1991, where it remained through to the 30th edition in 2015. Returning to a higher finger stick Hb requirement of at least 13.0 g/dL for male donors more closely approximates the physiological range for healthy men, although Caucasians tend to have higher Hb concentrations than individuals with African ancestry. The challenge remains that Hb screening prevents phlebotomy of individuals with significant anemia, but it often does not protect individuals who are iron depleted or deficient. Frequent blood donors predictably become iron depleted despite having acceptable predonation Hb levels of at least 12.5 g/dL and waiting the minimal 8 weeks between whole blood donations. On this matter, Mast and colleagues present results from a randomized placebo-controlled study on different approaches to maintain iron balance after whole blood donation.⁷ That five-arm study randomly assigned frequent donors to one of three intervention groups (19 mg or 38 mg iron tablets, or specific education about iron supplementation) or to two control groups (placebo or no iron-related information) and followed them after 2 years.⁷ Not surprisingly, frequent donors who did not take iron or who received no information had worsened iron sta-

tus with continued donation, but any one of the three intervention strategies was effective in mitigating iron loss.

Although the relation between blood donation and iron depletion, and ways to prevent it, are now well defined, other possible harms resulting from frequent donation are less clear or have not been studied. Offering new insight into donor health, Edgren and colleagues find no evidence to suggest that frequent blood donors are at increased risk of developing polycythemia vera as a result of the hematopoietic stimulus from repeated phlebotomy.⁸

DOOR 3: BLOOD DONOR DEMOGRAPHICS, RECRUITMENT, AND RETENTION

Several articles in this issue address aspects of blood safety that encompass having an adequate supply and effective strategies to recruit and retain healthy volunteer blood donors. Jóhannsdóttir and colleagues describe demographics of the donor base in Iceland and identify some trends in supply, demand, and donor retention of particular importance to their country.⁹ Three other articles in this section offer views on donors' perceptions about blood donation and its effect on motivation and donation behavior. Simply stated, people are more likely to experience anxiety when they do not know what to expect. Such perceptions might underlie the observation that many potential donors schedule appointments that they fail to keep. Anxiety and fear also increase the likelihood that a donor will experience an adverse reaction and dampens the probability of return donation. Masser and colleagues explore whether enhanced preparation materials can boost first donation appointment attendance.¹⁰ France and colleagues examine the effect of a brief, 10-minute telephone motivational interview that is more tailored to the individual than typical recruitment materials.¹¹ The motivational interview encourages blood donors to reflect upon what motivates them to donate blood and then develop strategies to cope with perceived barriers to donation. The approach appears to enhance subjects' motivation to donate again.¹¹ Chell and colleagues present a six-item scale to assess donor anxiety before blood donation and suggest that a standardized tool might be useful to gauge the effectiveness of interventions designed to identify anxious donors who are at increased risk of adverse reactions after blood donation.¹²

DOOR 4: TRANSFUSION-TRANSMITTED CYTOMEGALOVIRUS

Three articles in this issue address the ubiquitous yet problematic cytomegalovirus (CMV), which can be transmitted by cellular blood components and cause

severe disease in susceptible patients, such as very-low-birth-weight (VLBW) infants, fetuses receiving intrauterine transfusions, hematopoietic stem cell transplant recipients, and other immunosuppressed patient groups. Considerable variability in practice reflects different perceptions about selecting leukoreduced (LR) or CMV-seronegative cellular components or both LR and CMV-seronegative cellular components in various clinical settings to prevent transfusion-transmitted CMV (TT-CMV). For example, an informative survey (2009) of 183 different institutions showed that 65% of respondents considered CMV-seronegative and LR components equally effective in preventing TT-CMV¹³; yet practice patterns for different clinical settings differ from this view of equivalence, with the highest preference for CMV-seronegative units for preterm/VLBW infants expressed by 38% of respondents. The other respondents accepted LR-only (i.e., donors are not tested for CMV-antibody) or LR interchangeably with CMV-seronegative units based either on availability of tested units or routinely as a matter of institutional practice. Similar differences in surveyed preferences between CMV-seronegative and LR cellular components were observed for the other at-risk patient groups.¹³

In an effort to determine whether the scientific evidence favors a single strategy to reduce the risk of TT-CMV infection, Mainou and colleagues report the results of their systematic review and meta-analysis of studies that compare the use of LR cellular blood components with or without concurrent CMV testing in various immunosuppressed patient populations.¹⁴ Even though a definitive answer does not emerge to support clinical guideline development, the accompanying AABB committee report delineates alternative strategies that could be used for a clinical decision framework to guide practice.¹⁵ In light of the ongoing uncertainty and diverse preferences, the use of CMV-seronegative components will likely persist into the foreseeable future. Lancini and colleagues address the issue of the feasibility and sustainability of a CMV-seronegative red blood cell inventory in Australia.¹⁶ With a high (76%) seroprevalence of CMV in their donor population, their data suggest that demand will exceed the supply of CMV-seronegative cellular components by 2018 if current trends persist. Taken together, these studies illustrate the ongoing need for ordering practices to prevent inappropriate transfusion in general and inappropriate use of CMV-seronegative cellular components in particular as well as alternative preventive approaches, such as nucleic acid testing or pathogen reduction. Another intriguing possibility is the converse approach to select long-term CMV-seropositive donors combined with leukoreduction, which may offer an advantage over CMV-seronegative donors for preventing CMV-TTIs in at-risk patients.

DOOR 5: KNOWN, EMERGING, AND POTENTIAL TRANSFUSION-TRANSMITTED DISEASES

Next are perspectives on known, emerging, or potential transfusion-transmitted diseases, starting with the usual suspects. Estimating the risk of transmitting HIV, hepatitis C virus, and hepatitis B virus through blood transfusion is still of paramount importance in continuing to assess not only the current safety of donated blood in a country but also the cost effectiveness of proposed safety measures. The particular challenge for developing countries is that the models for estimating this residual risk of transfusion transmission rely on data from high-income countries to calculate the incidence-window period risk among the donor base. Different blood safety measures in medium-income and low-income countries and the difficulty of obtaining the necessary data for the models in these countries limit the applicability and usefulness of residual risk models and estimates from high-income countries. To address these issues, Mapako and colleagues describe an alternative model they adapted for use by the National Blood Service Zimbabwe that has less intense data requirements for developing countries.¹⁷

Turning to a relative newcomer, hepatitis E virus (HEV) is a zoonotic infection typically spread through the dietary route from contaminated pork and also by transfusions from silently infected blood donors. Several countries are accumulating data on the epidemiology and risk of HEV transmission through blood transfusion and clinical outcomes. In a study from the United Kingdom, Tedder and colleagues turn to the question of whether it is possible to identify and exclude HEV-infected individuals from the donor pool.¹⁸ Their results suggest that there are no workable deferral criteria to identify at-risk blood donors. Alternative approaches to prevent TT-HEV could rely on selecting seropositive donors with detectable HEV antibodies, which may prevent subsequent viremia, similar to the alternative approach previously mentioned for reducing TT-CMV risk.

Two articles in this section describe experimental animal models of known parasitic and potential bacterial transfusion-transmitted risks. In a rhesus macaque model, Gumber and colleagues describe experimental transfusion-induced *Babesia microti* infection and the dynamics of parasitemia and immune response.¹⁹ The model demonstrated the protracted duration of low levels of parasitemia that pose the most transfusion risk and confound strategies to prevent transfusion-transmitted babesiosis. In a Brief Report, Silva and colleagues describe a mouse model for transfusion transmission of *Bartonella henselae*, a fastidious Gram-negative bacillus that can infect and survive inside red blood cells.²⁰ The same group previously identified

EDITORIAL

Bartonella spp. in 1.2% of 500 Brazilian blood donors. Although transfusion transmission has not yet been demonstrated in humans, animal models in cats and now mice support the potential risk.²⁰

The ability of routine, conventional tests used to screen blood donors to detect rare or emergent strains of blood-borne viruses is addressed in the final two articles in this section. Faddy and colleagues demonstrate that the commercially available West Nile virus screening assay detected samples spiked with different virulent, endemic strains identified as the etiologic agent of encephalitis in Australia.²¹ Stramer and colleagues identify two HIV-2-positive donors by using routine anti-HIV-1/HIV-2 screening tests when only three other infected donors have been identified by blood donation screening.²² Of particular interest, one of the two newly identified donors did not fit the expected epidemiologic pattern for HIV-2 but was classified by using a sophisticated strategy, metagenomic next-generation sequencing. This method is capable of identifying any or all microorganisms in a clinical sample on the basis of sequence homology rather than specific primers for the suspected target.

DOOR 6: INNOVATIVE APPROACHES TO PATHOGEN DETECTION AND INACTIVATION

As the Zika epidemic in the Americas continues to unfold and threaten the blood supply, the race to develop and implement a specific nucleic acid-based test for the virus in affected areas is well underway. However, this reactive approach to blood safety is burdensome and time-consuming. In a proof-of-concept article, Kourout et al. describe a more flexible and more comprehensive platform that can simultaneously detect and identify many different bacterial, parasitic, and viral pathogens that cause known or potential TTIs.²³ The advanced technology uses a high-density DNA resequencing microarray technology and holds out the prospect not only for comprehensive coverage of many known and emerging blood-borne pathogens but also for greater discrimination by sequencing targeted regions of the infectious agents, which would facilitate epidemiologic studies, like the study described above for HIV-2.

Finally, pathogen-inactivation technologies offer the ultimate promise of a proactive approach because of the ability to inactivate a wide variety of pathogens through modification of nucleic acids to prevent their replication. The method described by Faddy and colleagues in this issue is the THERAFLEX UV-Platelets system (MacoPharma, Tourcoing, France), which uses ultraviolet C light but does not require the addition of a photosensitizing compound.²⁴ Their results demonstrate that the THERAFLEX UV-Platelets system is effective

against globally relevant and emerging arboviruses, including dengue, chikungunya, and Ross River. Although Zika virus was not tested in their study, its similarity with the other viruses makes it a likely target for this technology as well.

CONCLUSIONS

Reflecting on the variety, breadth, and depth of the articles in this collection, readers are bound to take away fresh insight into familiar problems in blood banking and transfusion medicine. Inevitably, perceptions between the known and unknown will continue to evolve as new information about emerging and potential risks becomes available to ultimately advance blood safety and protect donor health.

CONFLICT OF INTEREST

The author has no conflicts of interest relevant to the article submitted to **TRANSFUSION**. The opinions expressed herein are those of the author and do not represent the National Institutes of Health, the Department of Health and Human Services, or the US government.

Anne F. Eder, MD, PhD

e-mail: anne.eder@nih.gov

Department of Transfusion Medicine

*Clinical Center, National Institutes of Health,
Bethesda, MD*

REFERENCES

1. US Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Revised recommendations for reducing the risk of human immunodeficiency virus transmission by blood and blood products: guidance for industry. Washington (DC): US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research; 2015. [cited 2016 May 7]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/UCM446580.pdf>
2. O'Brien SE, Osmond L, Fan W, Yi QL, Goldman M. Impact of a 5-year deferral from blood donation for men who have sex with men. *Transfusion* 2016;56:00-00.
3. Germain M. The risk of allowing blood donation from men having sex with men after a temporary deferral: predictions versus reality. *Transfusion* 2016;56:00-00.
4. Willson S, Miller K, Seem D, Kuehnert MJ. Cognitive evaluation of the AABB Uniform Donor History Questionnaire. *Transfusion* 2016;56:00-00.
5. Eder AF, Dy BA, O'Neill EM. Predicted effect of selectively testing female donors for HLA antibodies to mitigate

- transfusion-related acute lung injury risk from apheresis platelets. *Transfusion* 2016;56:00-00.
6. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Final rule: requirements for blood and blood components intended for transfusion or for further manufacturing use. Code of Federal Regulations (CFR), 21 CFR Parts 606, 630, 640, 660 and 820. 80 FR 29841. [cited 2016 May 7]. Available from: <https://federalregister.gov/a/2015-12228>
 7. Mast AE, Bialkowski W, Bryant BJ, et al. A randomized, blinded, placebo-controlled trial of education and iron supplementation for mitigation of iron deficiency in regular blood donors. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 8. Edgren G, Nyrén O, Hultcrantz M, et al. Blood donation and risk of polycythemia vera. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 9. Jóhannsdóttir V, Gudmundsson S, Möller E, Aspelund T, Zoëga H. Blood donors in Iceland: a nationwide population-based study from 2005 to 2013. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 10. Masser B, France CR, Foot J, et al. Improving first-time donor attendance rates through the use of enhanced donor preparation materials. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 11. France CR, France JL, Carlson BW, et al. A brief motivational interview with action and coping components enhances motivational autonomy among blood donors. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 12. Chell K, Waller D, Masser B. The Blood Donor Anxiety Scale: a six-item state anxiety measure based on the Spielberger State-Trait Anxiety Inventory. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 13. Smith D, Lu Q, Yuan S, Goldfinger D, Fernando LP, Ziman A. Survey of current practice for prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus in the United States: leucoreduction vs. cytomegalovirus-seronegative. *Vox Sang* 2010;98:29-36.
 14. Mainou M, Alahdab F, Tobian AA, et al. Reducing the risk of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection: a systematic review and meta-analysis. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 15. AABB, Clinical Transfusion Medicine Committee, Heddle NM, Boeckh M, et al. AABB Committee Report: reducing transfusion-transmitted cytomegalovirus infections. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 16. Lancini DV, Faddy HM, Ismay S, Chesneau S, Hogan C, Flower RL. Cytomegalovirus in Australian blood donors: seroepidemiology and seronegative red blood cell component inventories. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 17. Mapako T, Janssen MP, Mvere DA, et al. Impact of using different blood donor subpopulations and models on the estimation of transfusion transmission residual risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus in Zimbabwe. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 18. Tedder RS, Tettmar KI, Brailsford SR, et al. Virology, serology and demography of hepatitis E viremic blood donors in South East England. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 19. Gumber S, Nascimento FS, Roger KA, et al. Experimental transfusion-induced *Babesia microti* infection: dynamics of parasitemia and immune responses in a rhesus macaque model. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 20. Silva MN, Vieira-Damiani G, Ericson ME, et al. *Bartonella henselae* transmission by blood transfusion in mice. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 21. Faddy HM, Flower RLP, Seed CR, et al. Detection of emergent strains of West Nile virus with a blood screening assay. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 22. Stramer SL, Yu G, Herron R, et al. Two human immunodeficiency virus Type 2 cases in US blood donors including serologic, molecular, and genomic characterization of an epidemiologically unusual case. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 23. Kourout M, Fisher C, Purkayastha A, et al. Multiplex detection and identification of viral, bacterial, and protozoan pathogens in human blood and plasma using a high-density resequencing pathogen microarray platform. *Transfusion* 2016;56:00-00.
 24. Faddy HM, Fryk JJ, Prow NA, et al. Inactivation of dengue, chikungunya, and Ross River viruses in platelet concentrates after treatment with ultraviolet C light. *Transfusion* 2016;56:00-00. ■

Anexo IV

Autorização do *Copyright* para inclusão do artigo publicado na tese

 <p>Copyright Clearance Center</p> <p><small>Note: Copyright.com supplies permissions but not the copyrighted content itself.</small></p>	
<p>Confirmation Number: 11580441 Order Date: 07/29/2016</p>	
<p>MARILENE NEVES silva Unicamp mnsilva31@gmail.com +55 (19)35219132 Payment Method: invoice</p>	<p>Billing address: Unicamp Rua Constantino Suriani 42 Campinas, SP 13043510 BR</p>

This is a License Agreement between Marilene Siva ("You") and Informa Healthcare ("Informa Healthcare") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Informa Healthcare, and the payment terms and conditions

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form

License number	69975586
License date	Jul 29, 2016
Licensed content publisher	Informa Healthcare
Licensed content publication	TRANSFUSION
Licensed content title	<i>Bartonella henselae transmission by blood transfusion in mice</i>
Licensed content author	Marilene Neves da Silva, Gislaine Vieira-Damiani, Marna Elise Ericson, et al
Licensed content date	Mar, 2016
Volume number	56
Issue number	1
Start page	1556
End page	1559
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor Type	Author of This Article
Format	Print and Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	no
Number of copies	50
Order reference number	
Title your thesis/dissertation	Translational research about infection by Bartonella henselae and its transfusion transmission
Expected completion date	August, 2016
Estimated Size (pages)	60
Total	0.0 USD